

Der Konzentrationsverlauf des Anti-Müller-Hormons  
im Reproduktionszyklus der Hündin

von Hans Christian Feulner

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Der Konzentrationsverlauf des Anti-Müller-Hormons im  
Reproduktionszyklus der Hündin

von Hans Christian Feulner

aus Kulmbach

München 2020

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Chirurgie der Kleintiere

Angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Mitbetreuung durch Dr. Beate Walter

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Koreferenten: Univ.-Prof. Dr. Nikolai Klymiuk  
Priv.-Doz. Dr. Wolfram Petzl

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

*„It's not the mountain we fight, it's ourselves“.*

Sir Edmund Hillary

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Der Reproduktionszyklus der Hündin</b>	<b>3</b>
1.1.	Allgemeiner Verlauf	3
1.2.	Endokrinologie	5
<b>2.</b>	<b>Die gynäkologische Untersuchung der Hündin</b>	<b>9</b>
2.1.	Äußere Adspektion der Geschlechtsorgane	9
2.2.	Duldungsprüfung	10
2.3.	Progesteronmessung	11
2.4.	Vaginoskopie	12
2.5.	Vaginalzytologie	14
2.5.	Sonografische Untersuchung der Ovarien	22
<b>3.</b>	<b>Das Anti-Müller-Hormon (AMH)</b>	<b>23</b>
3.1.	Synthese und Wirkung des Anti-Müller-Hormons	23
3.2.	Nachweismethoden	24
3.3.	Konzentrationsverlauf des Anti-Müller-Hormons im Sexualzyklus	26
3.3.1.	Einfluss des Alters auf die AMH-Konzentration im Serum	27
3.3.2.	Einfluss der Körpergröße auf die AMH-Konzentration im Serum	29
<b>4.</b>	<b>Klinische Anwendungsmöglichkeiten des AMH beim Menschen und Haustier</b>	<b>30</b>
4.1.	Bestimmung des Kastrationsstatus	30
4.2.	Diagnose des Ovarrestsyndroms	31
4.3.	Das Anti-Müller Hormon als Indikator für die ovarielle Reserve	32
4.4.	Das Anti-Müller-Hormon als Marker für Granulosazelltumoren	33
4.5.	Das Anti-Müller-Hormon als Marker für Sertolizelltumoren	34
4.6.	Das Anti-Müller-Hormon als Indikator für Kryptorchismus	35

<b>III</b>	<b>Untersuchungsgut, Material und Methoden</b>	<b>37</b>
<b>1.</b>	<b>Voruntersuchungen Teil eins: Bestimmung des Kastrationsstatus mit Hilfe der Serumkonzentration von AMH</b>	<b>37</b>
1.1.	Untersuchte Hündinnen	37
1.2.	Versuchsaufbau: Vergleich kastriert - intakt	38
1.3.	Statistische Auswertung der Daten	38
<b>2.</b>	<b>Voruntersuchungen Teil zwei: Bestimmung der Halbwertszeit des AMH im Serum nach Kastration</b>	<b>38</b>
2.1.	Untersuchte Hündinnen	38
2.2.	Versuchsaufbau: Halbwertszeit des AMH im Serum	39
<b>3.</b>	<b>Voruntersuchungen Teil drei: Bestimmung der AMH-Serumkonzentration bei Hündinnen in Abhängigkeit vom Kastrationszeitpunkt</b>	<b>39</b>
3.1.	Statistische Auswertung der Daten	39
<b>4.</b>	<b>Hauptstudie: Konzentrationsverlauf des AMH über den Reproduktionszyklus</b>	<b>40</b>
4.1.	Untersuchte Hündinnen	40
4.2.	Aufbau der Untersuchung	40
4.3.	Gynäkologische Untersuchung	41
4.3.1.	Untersuchung des äußeren Genitalbereichs	41
4.3.2.	Vaginalzytologie	42
4.4.	Hormonanalysen der Serumproben	43
4.4.1	Progesteronbestimmung	43
4.4.2	AMH-Bestimmung	43
4.5.	Statistische Auswertung der Daten	45

<b>IV</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
<b>1.</b>	<b>Voruntersuchungen Teil eins: Bestimmung des Kastrationsstatus mit Hilfe der Serumkonzentration von AMH</b>	<b>47</b>
1.1.	Intakte Hündinnen	47
1..2.	Kastrierte Hündinnen	48
<b>2.</b>	<b>Voruntersuchungen Teil zwei: Bestimmung der Halbwertszeit des AMH im Serum nach Kastration</b>	<b>50</b>
<b>3.</b>	<b>Voruntersuchungen Teil drei: Bestimmung der AMH-Serumkonzentration bei Hündinnen in Abhängigkeit vom Kastrationszeitpunkt</b>	<b>51</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse der Hauptstudie: Konzentrationsverlauf des AMHs über den Reproduktionszyklus</b>	<b>53</b>
<b>V</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
<b>1.</b>	<b>Bestimmung des Kastrationsstatus</b>	<b>58</b>
<b>2.</b>	<b>Bestimmung der Halbwertszeit des AMH im Serum nach Kastration</b>	<b>60</b>
<b>3.</b>	<b>Bestimmung der AMH-Serumkonzentration in Abhängigkeit vom Kastrationszeitpunkt</b>	<b>61</b>
<b>4.</b>	<b>Konzentrationsverlauf des AMH über den Reproduktionszyklus</b>	<b>61</b>
4.1	Absolute Werte, Maximal- und Minimalwerte	61
4.2	Maximalwerte als Indikator für GCTs	62
4.3	Einfluss der Zyklusstadien und gesamter Verlauf im Zyklus	62
<b>5.</b>	<b>Höhere AMH-Maximalkonzentrationen der Beaglehündinnen</b>	<b>65</b>
<b>6.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>65</b>
<b>VI</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>VII</b>	<b>Summary</b>	<b>68</b>
<b>VIII</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>
<b>IX</b>	<b>Anhang</b>	<b>77</b>
<b>1.</b>	<b>Abbildungen</b>	<b>77</b>



<b>2.</b>	<b>Tabellen</b>	<b>87</b>
<b>X</b>	<b>Danksagung</b>	<b>94</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMH	Anti-Müller-Hormon
Bakt.	Bakterien
BZ	Basalzellen
CL	Corpus luteum
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELFA	Enzyme-linked fluorescence assay
Erys	Erythrozyten
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GCT	Granulosazelltumor
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
ImZ	Intermediärzellen
LH	Luteinisierendes Hormon
min	minimal
max	maximal
MIS	Müllerian Inhibiting Substance
Neutros	Neutrophile Granulozyten
ORS	Ovarrest-Syndrom, Ovarian Remnant Syndrome
PIF	Prolactin Inhibiting Factor
post ov.	post ovulationem
prä ov.	prä ovulationem
PRL	Prolactin
OV	Ovulation
PbZ	Parabasalzellen
PGE2	Prostaglandin E2
Tab.	Tabelle
TGFβ	transforming-growth-factor-β
SE	standard error, Standardabweichung
SfZ	Superfizialzellen
ZD	Zelldetritus

**1.           Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1:</b>	Hormoneller Regelkreis des Sexualzyklus der Hündin	5
<b>Abb. 2a</b>	Ausschüttung von GnRH, LH und FSH während des Anöstrus,	6
<b>&amp; 2b:</b>	gemessen im Portalvenenplexus der Hypophyse eines Schafes	
<b>Abb. 3:</b>	Typisches Verlaufsmuster von 17- $\beta$ -Estradiol, LH und Progesteron	8
<b>Abb. 4:</b>	Vaginalzytologisches Präparat, BZ: Basalzellen	16
<b>Abb. 5:</b>	Vaginalzytologisches Präparat, PbZ: Parabasalzellen	16
<b>Abb. 6:</b>	Vaginalzytologisches Präparat, Im: Intermediärzellen	17
<b>Abb. 7:</b>	Vaginalzytologisches Präparat, SfZ: Superfizialzellen	18
<b>Abb. 8:</b>	Vaginalzytologisches Präparat, S: Schollen	18
<b>Abb. 9:</b>	Vaginalzytologisches Präparat, MöZ: Metöstruszelle	19
<b>Abb. 10:</b>	Vaginalzytologisches Präparat, SchaumZ: Schaumzelle	20
<b>Abb. 11:</b>	Wirkungen des AMH im Ovar	24
<b>Abb. 12:</b>	Invers korrelierte Serum-AMH-Konzentrationen bei Frauen steigenden Alters.	27
<b>Abb. 13:</b>	Schematische Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs im Leben des Mannes.	29
<b>Abb. 14:</b>	Dotplot der AMH-Konzentrationen der intakten Hündinnen	47
<b>Abb. 15:</b>	Boxplots der AMH-Konzentrationen von den intakten und kastrierten Tieren.	48
<b>Abb. 16:</b>	AMH-Konzentrationsverlauf nach Kastration als Strichdiagramm	50
<b>Abb. 17:</b>	ROC-Kurvenanalyse	52
<b>Abb. 18:</b>	Dotplots aller gemessenen AMH-Serumkonzentrationen	54
<b>Abb. 19:</b>	Säulendiagramm des mittleren AMH-Konzentrationsverlaufes aller Hündinnen über den gesamten Reproduktionszyklus	56
<b>Abb. 20:</b>	Säulendiagramm der mittleren AMH-Konzentrationen über den Zyklus im Vergleich Beagle mit FBIs	57

## **2. Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b>	Untersuchungsprotokoll „Lotte“	45
<b>Tabelle 2:</b>	AMH-Konzentrationen der intakten und der kastrierten Hündinnen der Voruntersuchung Teil 1	49
<b>Tabelle 3:</b>	AMH-Konzentrationen im Zeitverlauf von Tag 0 bis 10 nach erfolgter Kastration bei den Hündinnen Nr. 12 bis Nr. 19	51
<b>Tabelle 4:</b>	Anzahl der Blutproben, Median-, Minimal- und Maximalwerte der AMH-Serumkonzentrationen pro Untersuchungszeitpunkt	52

## **I Einleitung**

Das Anti-Müller-Hormon (AMH) ist ein Proteinhoromon, das beim Menschen und Säugetier ausschließlich in den Granulosazellen der Ovarien und den Sertolizellen des Hodens sezerniert wird (Günzel-Apel 2016c; Schnorr und Kressin 1989). Am besten bekannt ist seine Wirkung in der embryonalen Entwicklung des Menschen und Haustieres. Hier sorgt es zusammen mit Testosteron für die Rückbildung der Müller'schen Gänge und führt damit zur Ausbildung männlicher Geschlechtsorgane (Schnorr und Kressin 1989). Im Körper der erwachsenen Frau und des adulten weiblichen Tieres hemmt AMH die gleichzeitige Entwicklung zu vieler Follikel aus dem Primordialfollikelpool (Durlinger et al. 1999; 2002). Durch Bestimmung der AMH-Konzentration werden in der Humanmedizin unter anderem Rückschlüsse auf das Potential der ovariellen Reserve von Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch gezogen (Visser et al. 2006). Neue Forschungsergebnisse geben Hinweise darauf, dass es ähnliche Korrelationen zwischen der AMH-Konzentration und dem Reproduktionspotenzial bei Hündinnen geben könnte (Hollinshead et al. 2017). Die erfolgreiche Konzeption und Trächtigkeit sowie Hinweise auf zukünftige Wurfgrößen könnten durch die AMH-Serumkonzentration erkannt werden (Hollinshead et al. 2017). Durch die alleinige Sekretion in den Gonaden gibt der Nachweis von AMH im Blut Aufschluss über die Existenz und den Zustand von Keimdrüsen im Körper. Die Frage nach dem Vorhandensein von Ovarien beim weiblichen Tier bei unbekanntem Kastrationsstatus oder klinischen Anzeichen des Ovarrest-Syndroms sind Indikationen, bei denen die Messung des AMH Aufschluss geben kann (Place et al. 2011; Axner und Ström Holst 2015; Turna Yilmaz et al. 2015; Themmen et al. 2016). Beim männlichen Tier kann mit einem AMH-Nachweis ein kryptorchider Hoden diagnostiziert werden (Gharagozlou et al. 2014; Hornakova et al. 2017). Stark erhöhte AMH-Serumwerte können Hinweise auf neoplastische Entartungen der AMH produzierenden Zellen von Ovarien und Hoden geben (Ball et al. 2008; Banco et al. 2010; Holst und Dreimanis 2015).

Physiologische Konzentrationsverläufe des AMHs wurden bereits bei Stuten und Kühen beschrieben (Almeida et al. 2011; El-Sheikh Ali et al. 2013; Rico et al. 2011). Bei Stuten war der Konzentrationsverlauf über den Zyklus relativ konstant und wurde weder von der Trächtigkeit noch von den Zyklusstadien an sich beeinflusst (Almeida et al. 2011). Bei Kühen zeigten zwei Studien ebenfalls keine signifikanten Konzentrationsschwankungen während des

Zyklus und der Trächtigkeit (El-Sheikh Ali et al. 2013; Nabenishi et al. 2017). In einer anderen Arbeit wurde bei Kühen jedoch ein AMH-Peak am ersten Tag des Zyklus beschrieben (Rico et al. 2011).

Über den physiologischen Konzentrationsverlauf des AMHs während des Sexualzyklus der gesunden Hündin ist noch wenig bekannt. Lediglich ein Anstieg der AMH-Konzentration im Übergang vom Anöstrus zum Proöstrus wurde bisher beschrieben (Nagashima et al. 2016). Dieses Wissen könnte jedoch Aufschluss über eine bevorstehende Läufigkeit einer Hündin geben und für züchterische Zwecke interessant sein. Um die AMH-Serumkonzentrationen von Hündinnen zu unterschiedlichen klinischen Fragestellungen richtig zu interpretieren, werden physiologische Referenzbereiche benötigt. Zusammenhänge zwischen dem Reproduktionspotenzial einer Hündin und der Serum-AMH-Konzentration wurden erst jüngst erkannt (Hollinshead et al. 2017) und lassen sich ohne das Wissen von normalen Konzentrationsbereichen nur schwer interpretieren. Da es bisher keine Untersuchungen zum physiologischen Konzentrationsverlauf des AMH während des Fortpflanzungszyklus der Hündin gibt, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, diese Lücke zu schließen.

Daneben sollte in der vorliegenden Studie in Vorversuchen auch auf die Frage nach dem Kastrationsstatus von Hündinnen mittels vergleichenden Messungen von AMH im Serum von kastrierten und intakten Hündinnen in genau definierten Zyklusstadien untersucht werden. Darüber hinaus sollte durch zeitlich gestaffelte AMH-Messungen nach erfolgter Ovarhysterektomie versucht werden, die Halbwertszeit des AMHs bei der Hündin zu ermitteln. Bisher konnte die AMH-Halbwertszeit im Blutserum nur bei bereits ovarhysterektomierten Frauen bestimmt werden (Griesinger et al. 2012). Veterinärmedizinische Studien zur Serum-Halbwertszeit von AMH wurden bisher nur bei Kälbern (Vigier et al. 1983) und Stuten (Almeida et al. 2011) durchgeführt.

## II Literaturübersicht

### 1. Der Reproduktionszyklus der Hündin

#### 1.1. Allgemeiner Verlauf

Der weibliche Haushund (*Canis lupus familiaris*) besitzt einen nicht-saisonalen und monöstrischen Sexualzyklus, welchen die meisten Hündinnen zweimal pro Jahr durchlaufen, wobei eine rassetypische und individuelle Bandbreite von einem bis zu vier Zyklen pro Jahr bestehen kann (Johnston et al. 2001). Im Gegensatz zum domestizierten Hund zeigen die wilden Vertreter der Canidae, wie der Wolf (*Canis lupus*), der Kojote (*Canis latrans*) und der Dingo (*Canis lupus dingo*) nur einmal im Jahr einen saisonalen Reproduktionszyklus (Jöchle und Andersen 1977). Es wurde herausgefunden, dass Beagle-Hündinnen, die ganzjährig ohne künstliches Licht und Heizung in Außenhaltung lebten, den Östrus überwiegend nur einmal jährlich und zwar vornehmlich im Monat Mai durchliefen (Kreeger und Seal 1992). Eine den natürlichen Lebensumständen des Wildcaniden angepasste Haltung könnte folglich den Sexualzyklus des Haushundes beeinflussen, wenn nicht sogar auf den der wilden Vorfahren zurückführen. Die unter üblichen Bedingungen gehaltenen Haushunde können prinzipiell in jedem Kalendermonat Deckbereitschaft signalisieren, es zeigte sich jedoch eine Häufung der Läufigkeiten gegen Ende des Winters und im beginnenden Frühjahr (Jöchle und Andersen 1977). Der Sexualzyklus der Hündin weist normalerweise eine Gesamtdauer von 6 bis 8 Monaten auf, wobei individuelle Unterschiede in einem Rahmen von 5 bis 12 Monaten auftreten können (Günzel-Apel 2016b).

Der Reproduktionszyklus der Säugetiere wurde bereits um 1900 von Heape eingeteilt in die Phasen:

- Proöstrus, der Beginn des Sexualzyklus
- Östrus, die Phase der Paarungsbereitschaft
- Metöstrus, die Phase abklingender sexueller Aktivität und
- Anöstrus, die Phase sexueller Ruhe.

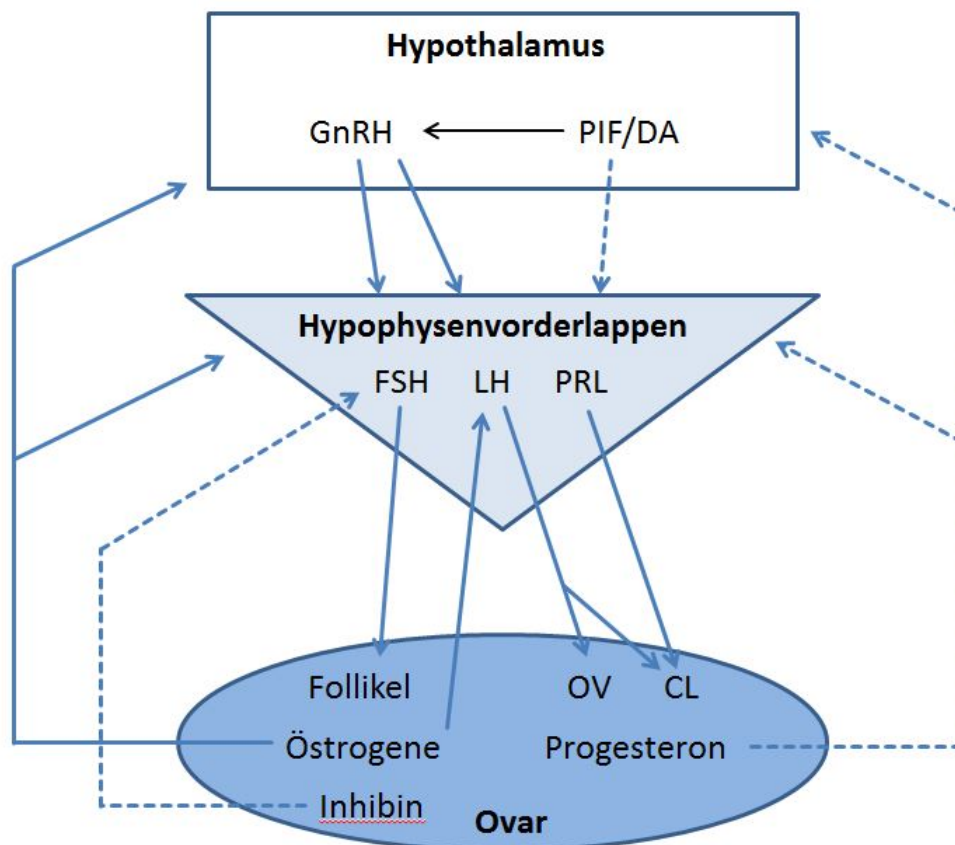
Der Proöstrus bildet gemeinsam mit dem Östrus die Läufigkeit (Günzel-Apel und Bostedt 2016b; Concannon 2011). Sie beginnt mit dem ersten Austritt von blutigem Läufigkeitssekret aus der Vulva und endet mit dem Einsetzen der Paarungsbereitschaft. Der Proöstrus dauert im Durchschnitt neun Tage, kann aber individuell zwischen drei und 20 Tagen variieren. Im Laufe des Proöstrus schwillt die Vulva der Hündin an (Jöchle und Andersen 1977; Goodman 2001). Die Hündin wird nun für den Rüden zunehmend interessanter, sie zeigt vermehrte Aktivität wie unfolgsames Umherlaufen und vermehrtes Harnabsetzen (England 2010). Das Aufspringen und Decken durch den Rüden erlaubt sie in diesem Zeitraum jedoch noch nicht. Die Akzeptanz des Rüden, das „Stehen“ der Hündin und die Erlaubnis des Aufspringens, kennzeichnen den Beginn des Östrus. Er beinhaltet die Ovulation und gegebenenfalls den Deckakt. Wie der Proöstrus besitzt auch der Östrus eine durchschnittliche Länge von neun Tagen, mit einer individuellen Bandbreite von drei bis 14 Tagen (Concannon 2011). Helles, fleischwasserfarbenes Läufigkeitssekret und eine teigige Konsistenz der Vulva sind das Merkmal dieser Zyklusphase. Der Östrus hält so lange an, bis die Hündin die Annäherung des Rüden nicht mehr duldet (Jöchle und Andersen 1977). Das zunehmend aversive Verhalten der Hündin gegenüber interessierten Rüden stellt den Beginn des Metöstrus dar (Christie und Bell 1972). Seine Dauer wird in der Literatur uneinheitlich angegeben, da die Regeneration des Endometriums nach Abklingen jeglicher zyklischen Aktivität teilweise bereits dem Anöstrus zugeordnet wird (Concannon 2011). Unter klinischen Aspekten macht es jedoch Sinn, den Metöstrus in eine zweimonatige Phase der Gelbkörperaktivität und in eine zweieinhalbmonatige Phase der Endometriumsreparatur einzuteilen (Günzel-Apel und Bostedt 2016b). Die zwei Monate der Lutealphase stellen den Zeitraum der Trächtigkeit oder, bei nicht erfolgter Konzeption, der Scheinträchtigkeit dar. Somit kann der Begriff „Anöstrus“ ausschließlich der ovariellen Ruhe und dem regenerierten, hormonell unbeeinflussten Endometrium zugeordnet werden (Günzel-Apel 2016b). Die Vulva der Hündin kann zu Beginn des Metöstrus noch eine leichte Vergrößerung und eine leicht teigige Konsistenz aufweisen (Wehrend 2010). Im Verlauf dieser Zyklusphase bildet sich die Vulva zu ihrer ursprünglichen Größe zurück. Geringe Mengen weißlichen Sekrets können zu Beginn dieser Phase aus der Rima vulvae abgesondert werden (Wehrend 2010). Der Anöstrus stellt die Ruhephase des caninen Reproduktionszyklus dar, in welchem die Hündin für Rüden nicht zur Paarung bereitsteht (Johnston et al. 2001). Er weist unter den Phasen des Sexualzyklus der Hündin die größte Variabilität auf und kann von einem bis zu sechs Monaten betragen (Günzel-Apel 2016b). Somit bestimmt der Anöstrus die Gesamtlänge des Zyklus am nachhaltigsten. Im Anöstrus zeigen sich die äußeren Genitalan-



teile klein und die Hündin zeigt physiologischer Weise keinen oder nur minimalen Vaginalausfluss (Johnston et al. 2001; Wehrend 2010).

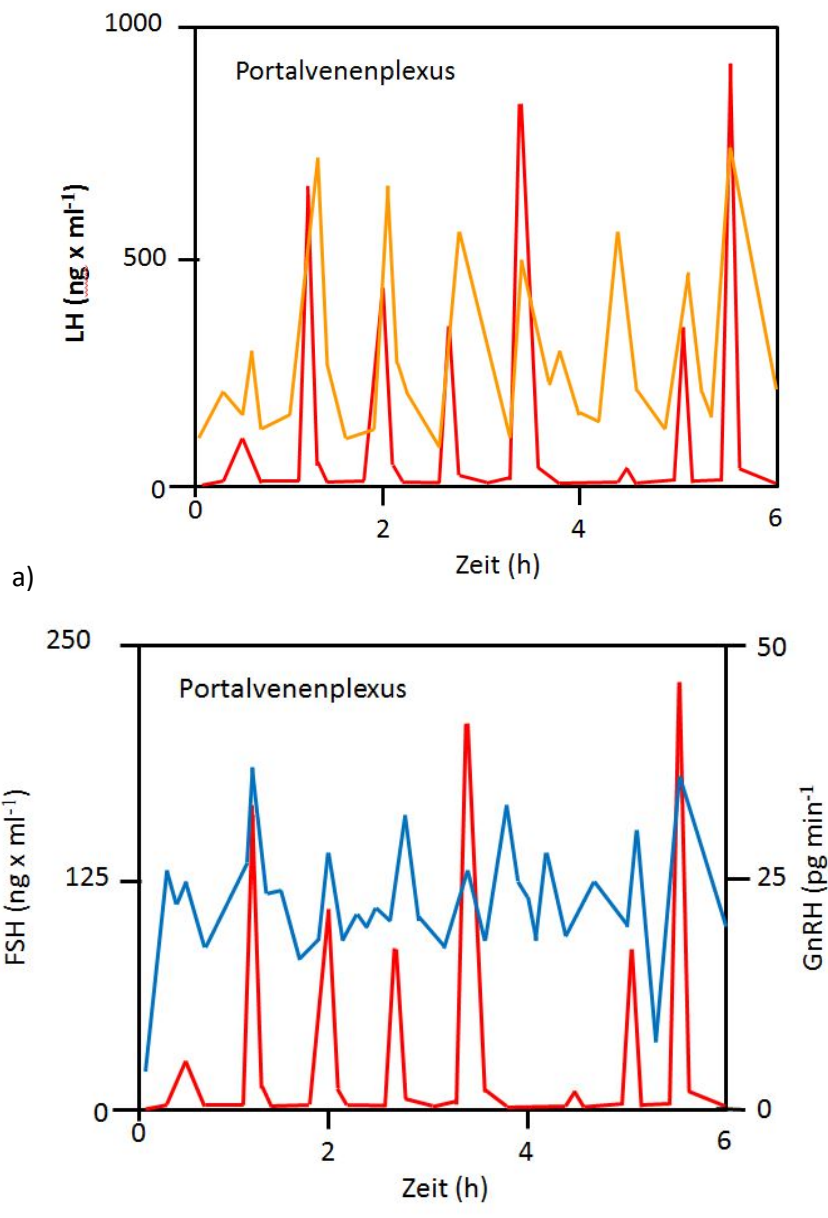
## 1.2. Endokrinologie

Die sexuelle Aktivität der Haustiere unterliegt einem endokrinen Regelkreis (von Engelhardt und Breves 2010). Die Steuerzentren dieser Hormonausschüttungen sind in hierarchischer Funktionsfolge der Hypothalamus, die Hypophyse und letztlich die weiblichen beziehungsweise männlichen Keimdrüsen (von Engelhardt und Breves 2010); (Abb. 1).



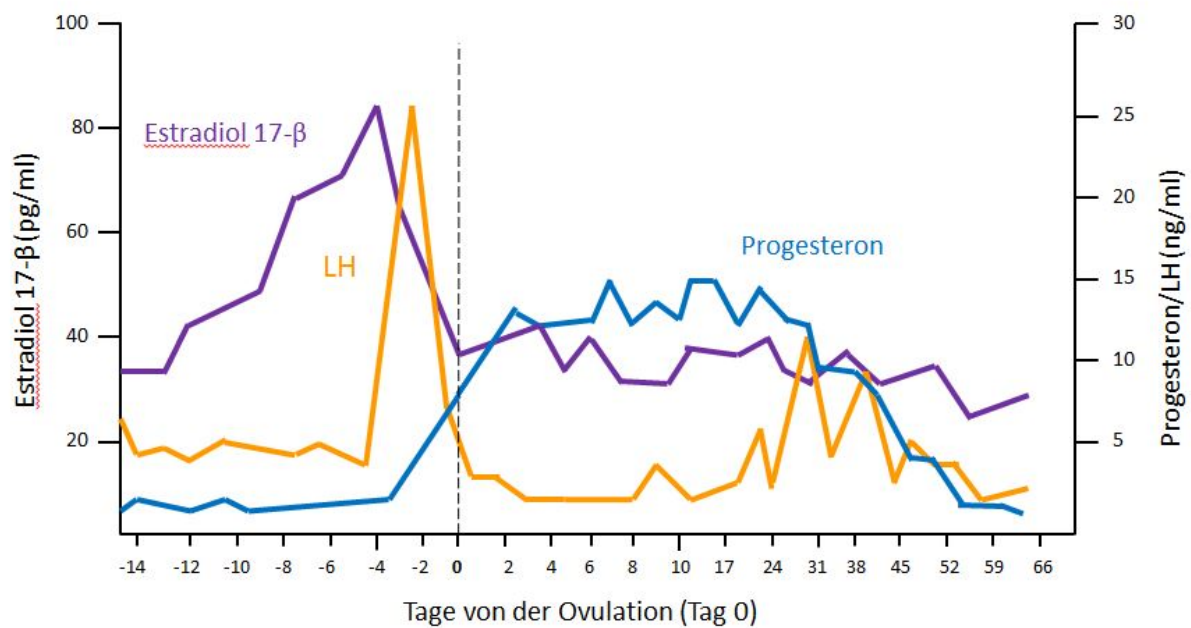
**Abb.1:** Hormoneller Regelkreis des Sexualzyklus der Hündin (aus Günzel-Apel 2016a). Durchgezogene Linien: stimulierend; gestrichelte Linien: inhibierend. Abkürzungen: GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone, PIF: Prolactin Inhibierender Faktor, DA: Dopamin, FSH: Follikelstimulierendes Hormon, LH: Luteinisierendes Hormon, PRL: Prolactin, OV: Ovulation, CL: Corpus luteum

Das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) wird im Hypothalamus synthetisiert und pulsatil freigesetzt (Padmanabhan und McNeilly 2001); (Abb. 2a & 2b). Es gelangt über ein Portalgefäßsystem in den Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse). Dort bewirkt es die dem Rhythmus des GnRH folgende Ausschüttung von Luteinisierendem Hormon (LH) und die zum Teil GnRH-synchrone, zum Teil aber auch GnRH-unabhängige, basale Ausschüttung von Follikelstimulierendem Hormon (FSH), (Padmanabhan und McNeilly 2001).



**Abb. 2a & 2b:** Ausschüttung von GnRH, LH und FSH während des Anöstrus, gemessen im Portalvenenplexus der Hypophyse eines Schafes. Rot: GnRH, orange: LH, blau: FSH (aus Padmanabhan und McNeilly 2011).

Der Anöstrus ist aus endokrinologischer Sicht betrachtet keine Phase des Ruhezustandes (Johnston et al. 2001). Im Fortschritt des Anöstrus kommt es zu einer Steigerung der pulsati- len Ausschüttung von FSH und LH aus der Adenohypophyse (Padmanabhan und McNeilly 2001). Die Ausschüttung von FSH im späten Anöstrus führt zur Anbildung von Follikeln im Ovar, welche mit zunehmender Größe immer mehr Östrogene (insbesondere 17- $\beta$ -Estradiol) produzieren (Wehrend 2010). Durch den inhibitorischen Effekt der Östrogene (negative Rückkopplung) und dem in den Granulosazellen des Follikels gebildeten Inhibin kommt es zu einer fortschreitenden Hemmung der FSH-Ausschüttung (Wehrend 2010; Günzel-Apel 2016a). Ungefähr einen Monat vor dem LH-Peak und der Ovulation beginnt das Östradiol im Blut anzusteigen (Abb. 3); (Johnston et al. 2001). Äquivalent zum Anstieg des Östrogens sin- ken LH und FSH oft auf die niedrigste Konzentration während des gesamten Zyklus ab (Con- cannon 2011). Im späten Proöstrus, dem Endstadium der Follikelreifung, besteht sodann ein maximaler Östrogenspiegel, welcher durch die positive Rückkopplung auf die Adenohypo- physe zu einem sprunghaften, ein bis drei Tage andauernden Anstieg des LHs, dem LH-Peak führt (Mellin et al. 1976; Concannon 2011). Der LH-Peak markiert das endokrinologische Ende des Proöstrus. Unter dem Einfluss des LHs kommt es bei der Hündin zur Luteinisierung der Granulosazellen des Follikels und zwei bis drei Tage später zur Ovulation (Concannon 2011). Der Östrus beginnt kurz vor dem LH-Peak. Zu diesem Zeitpunkt beginnt Östrogen abzufallen und Progesteron anzusteigen (Concannon 2011); (Abb. 3). Dieser präovulatorische Progesteronanstieg findet sich im Gegensatz zu den anderen Haussäugetieren ausschließlich bei der Hündin (Johnston et al. 2001). Die Akzeptanz des Rüdens, das „Stehen“ der Hündin, also der im Verhalten der Hündin bemerkbare Beginn des Östrus, korreliert allerdings nicht immer zeitgleich mit der hormonellen Situation (Mellin et al. 1976). Parallel zum LH-Anstieg kommt es zur Überschreitung des Basalwertes ( $>2\text{ng/ml}$ ) des im Blut messbaren Progesterons und danach zu einem schnellen Anstieg auf über 5 bis 10 ng/ml zum Zeitpunkt der Ovulation (Concannon 2011). In der Literatur werden zum Zeitpunkt der Ovulation Progesteronkonzent- rationen von durchschnittlich  $5,7 \pm 1,3\text{ ng/ml}$  (Phemister et al. 1973), 6 ng/ml (Concannon et al. 1975), 5 ng/ml (Günzel-Apel et al. 1990) oder 4-10 ng/ml (Manothaiudom et al. 1995) angegeben. Zwischen Zyklustag 20 und 35 erreicht das Progesteron maximale Konzentratio- nen zwischen 15 und 80 ng/ml (Concannon 2011) und fällt danach, einhergehend mit der Gelbkörperregression (Luteolyse) im späten Metöstrus, langsam wieder ab.



**Abb. 3:** Typisches Verlaufsmuster von 17-β-Estradiol, LH und Progesteron während der Follikelphase, Ovulation und Gelbkörperphase im Sexualzyklus nicht gravider Hündinnen (aus Günzel-Apel 2016a).

Im Gegensatz zu den anderen Haustieren wird die Gelbkörperregression bei der Hündin nicht durch im Uterus gebildetes Prostaglandin F2α ausgelöst (Olson et al. 1982; Hoffmann et al. 1992). Es stellte sich sogar heraus, dass bei im Metöstrus hysterektomierten Hündinnen der Verlauf des Progesterons, Estradiols 17beta, Prolactins und des Wachstumshormons der gleiche blieb wie bei intakten Vergleichshündinnen (Hoffmann et al. 1992). Die Funktion des Gelbkörpers wird bei der Hündin stattdessen durch das aus der Adenohypophyse ausgeschüttete Prolactin erhalten (Okkens et al. 1986). Neuere Studien fanden Hinweise auf eine luteotrope Funktion von Prostaglandin E2 (PGE2). So konnte die Beteiligung von PGE2 an der Entwicklung des Gelbkörpers bei der Hündin festgestellt werden und PGE2 die Anzahl der Prolactinrezeptoren an Luteinzellen erhöhen (Kowalewski et al. 2015). Ab dem 30. bis 35. Tag des Zyklus stieg die Prolactinkonzentration, während die Progesteronkonzentration abfiel (Wehrend 2010). Dieser scheinbare Widerspruch hat seine Ursache in einer sinkenden Expression von Prolactinrezeptoren am Ovar (Kowalewski et al. 2015).

Hinzu kommt der Einfluss des Dopamins, auch Prolactin-Inhibiting-Factor genannt, welches die Sekretion des Prolactins fortschreitend hemmt und so zur Gelbkörperregression beiträgt

(Günzel-Apel 2016a). Der endokrinologische Übergang vom Metöstrus zum Anöstrus wird in älterer Literatur durch ein Absinken der Progesteronkonzentration auf basale Konzentrationen gekennzeichnet (Wehrend 2010). Aus klinischer Sicht ist es sinnvoll, den Anöstrus erst der Phase der endokrinologischen Ruhe des Endometriums nach circa viereinhalb Monaten zuzurechnen (Günzel-Apel 2016b).

## **2.      Die gynäkologische Untersuchung der Hündin**

Ziel der Zyklusdiagnostik ist die Erfassung des aktuellen Zyklusstandes der Hündin und die Bestimmung des Ovulationszeitpunktes. Das Erkennen der Ovulation ist essentiell für die Bestimmung des Deckzeitpunktes, des Wurftermins und ihr Ausbleiben kann Hinweis auf Funktionsstörungen der Ovarien geben (Bunck und Günzel-Apel 2016). Die Ovarien durchlaufen während ihrer zyklischen Aktivität verschiedene Morphologien und endokrinologische Funktionszustände. Die von den Ovarien sezernierten Hormone bestimmen im Zyklusverlauf das Erscheinungsbild und die Konsistenz der äußeren und inneren Sexualorgane. Auch das sexuell interessierte oder aversive Verhalten der Hündin gegenüber dem Rüden wird von den Hormonen der Ovarien beeinflusst und gibt erste Hinweise auf die Phase des Reproduktionszyklus, in welchem sich die Hündin befindet (Mellin et al. 1976). Ödematisierung der Vulva und blutiger Vaginalausfluss zeigen deutlich eine Läufigkeit an (Concannon 2011). Die Messung der Progesteronkonzentration im Blut der Hündin ist der Goldstandard für die Bestimmung des Ovulationszeitpunktes, sollte aber mit einer klinischen Untersuchung der Hündin kombiniert werden (Günzel-Apel und Bostedt 2016). Eine vollständige klinische Untersuchung umfasst neben der Adspektion und Palpation der äußeren Geschlechtsorgane eine Vaginoskopie und eine exfoliative Vaginalzytologie (Wehrend 2010). Eine Ultraschalluntersuchung der Ovarien zur Bestimmung des Ovulationszeitpunktes ist möglich und wurde in wissenschaftlichen Studien durchgeführt, findet aber in der Praxisroutine wenig Anwendung (Ball et al. 2010).

### **2.1.      Äußere Adspektion der Geschlechtsorgane**

Bei der äußeren gynäkologischen Untersuchung werden die Adspektion und Palpation der

äußerlichen Geschlechtsorgane durchgeführt. Die äußere Untersuchung des Genitalbereiches bezieht die Größe und Konsistenz der Vulva sowie die Beurteilung des austretenden Läufigkeitssekrets ein (Bunck und Günzel-Apel 2016). Die beginnende Schwellung der Vulva und der erstmalige Austritt von blutigem Läufigkeitssekret aus der Rima vulvae markiert den Beginn des Proöstrus (Concannon 2011). Diese Ödematisierung ist die Folge der steigenden Ausschüttung von 17- $\beta$ -Östradiol. Das Hormon bewirkt eine erhöhte Durchlässigkeit der kleinen Uteringefäße, wodurch Erythrozyten in das Uteruslumen gelangen, was als Diapedesisblutung bezeichnet wird und mit Uterinsekret vermischt durch die Vagina nach außen sickern (Bunck und Günzel-Apel 2016). Das Läufigkeitssekret wird hinsichtlich Menge und Färbung beurteilt (Wehrend 2010). Im frühen Proöstrus ist das Läufigkeitssekret dunkelrot, während es im Fortschritt der Läufigkeit immer heller wird und in Ovulationsnähe fleischwasserfarben erscheint, da die Permeabilität der Blutgefäße aufgrund des sinkenden Östrogenspiegels abnimmt (Wehrend 2010). Im Verlauf des Proöstrus schwillt die Vulva unter dem Einfluss der Östrogene zunehmend an und ihre Konsistenz wird praller (Jöchle und Andersen 1977; Concannon 2011). Hochgradige Ödematisierung der Vulva zeigt die maximale endokrine Aktivität der Ovarfollikel und den höchsten Östrogenspiegel an. Durch leichten Druck mit dem Finger auf den Vulvabereich kann der Ödematisierungsgrad geprüft werden (Bunck und Günzel-Apel 2016). Die maximale Ödematisierung der Vulva geht im Östrus zurück, ab jetzt zeigen sich kleine Sekundärfältchen in den Labien (Wehrend 2010). Im späten Östrus und anschließenden Metöstrus verliert die Vulva fortschreitend an Umfang, da die Östrogenkonzentration nach der maximalen Follikelanbildung rapide abfällt (Concannon 2011). Im späten Metöstrus und im Anöstrus ist äußerlich keine Ödematisierung der Vulva mehr erkennbar (Wehrend 2010). Im anfänglichen Metöstrus können noch geringe Mengen weißlichen Ausflusses beobachtet werden, welche aber bald verschwinden (Wehrend 2010).

### 2.2. Duldungsprüfung

Eine nahende Läufigkeit deutet sich bei der Hündin durch häufiges Harnmarkieren und unfolgsames Umherlaufen an, worauf der Name „Läufigkeit“ beruht (Bunck und Günzel-Apel 2016; Jöchle und Andersen 1977). Im Proöstrus zeigt die Hündin bereits spielerisch sexuell interessiertes Verhalten gegenüber Rüden, erlaubt den Aufsprung jedoch noch nicht (Bunck und Günzel-Apel 2016; Concannon 2011). Die Paarungsbereitschaft zeigt schließlich den

Beginn des Östrus an (Bunck und Günzel-Apel 2016). Das spielerische Interesse mündet in bereitwilligem Stehen, Beiseitelegen der Rute und Akzeptanz des Aufsprungs durch den Rüden. Die Duldung verschwindet rasch zum Ende des Östrus und Beginn des Metöstrus (Christie und Bell 1972; Bunck und Günzel-Apel 2016). Durch die Duldungsprüfung kann der Duldungsreflex, also das bereitwillige Stehen der Hündin mit Beiseitelegen der Rute, geprüft werden (Wehrend 2010). Die Duldungsprüfung stellt einen einfachen, auch vom Tierbesitzer durchzuführenden Test der Paarungsbereitschaft der Hündin dar. Zur Durchführung der Duldungsprüfung krault man die Hündin seitlich der Vulva; im positiven Fall nimmt die Hündin den Schwanz zur Seite und zieht die Vulva nach dorsal (Wehrend 2010). Die Duldung ist im Zeitraum des Östrus am ausgeprägtesten; sie beginnt bei sinkender Östrogen- und steigender Progesteronkonzentration (Johnston et al. 2001).

### 2.3.      Progesteronmessung

Steht die Ovulation kurz bevor, beginnt das Progesteron, zeitlich eng mit dem präovulatorischen LH-Anstieg verknüpft, auf Werte über das Basalniveau hinaus anzusteigen (Johnston et al. 2001). Je nach angewandtem Testsystem werden Basalbereiche von  $< 0,5$  ng/ml,  $< 1$  ng/ml und  $< 2$  ng/ml (Bouchard et al. 1993; Concannon et al. 1975; Brugger et al. 2011) angegeben. Der Progesteronwert steigt 48 bis 24 Stunden vor der Ovulation erstmals über den Basalwert an (Concannon et al. 1975; Bouchard et al. 1991). Der präovulatorische Anstieg des Progesterons findet sich im Gegensatz zu anderen Haustieren nur bei der Hündin (Concannon et al. 1975).

Dieser initiale Anstieg des Progesterons kann individuellen Schwankungen unterliegen (de Gier et al. 2006). So stieg Progesteron bei drei Versuchshunden bereits 12 bis 4 Stunden vor dem LH-Peak, bei zweien gleichzeitig mit jenem und bei einer Hündin 20 Stunden danach an (de Gier et al. 2006). In der Literatur werden Bereiche von 2,0 bis 2,9 ng/ml (Johnston et al. 2001), 0,5 bis 2,0 ng/ml (Bouchard et al. 1993) und 0,8 bis 3,0 ng/ml (Goodman 2001) für diesen ersten Anstieg über das Basalniveau angegeben. Der rasche Anstieg des LHs sorgt für eine Luteinisierung der Granulosa- und der Thekainternazellen der Follikel. Es wird vermutet, dass der durch den LH-Peak angestoßene Progesteronanstieg in den Follikeln einer der auslösenden Faktoren der Follikelreifung und dadurch wenig später der Ovulation ist (Concannon

2009). Der Progesteronwert zum Zeitpunkt der Ovulation wird von verschiedenen Autoren in den Bereichen von  $\geq 5\text{ ng/ml}$  (Concannon 2011), 3 bis 5 ng/ml bzw. je nach Assay 5 bis 8 ng/ml (Günzel-Apel 2016a), 4 bis 10 ng/ (Manothaiudom et al. 1995) beschrieben. Progesteron kann mit quantitativen oder semiquantitativen Testsystemen gemessen werden. Zwar erbringen semiquantitative Testsysteme wie z.B. Hormonost<sup>®</sup> (Fa. Biolab) oder Target<sup>®</sup> (Fa. BioMetallics) schnelle Ergebnisse und sind somit für die tägliche Praxis interessant, jedoch geben diese Testkits jeweils nur Bereiche der Progesteronkonzentration an. Sie sind daher nur in Verbindung mit einer gynäkologischen Untersuchung zu bewerten (Hospes et al. 2004). Damit fehlt diesen Testsystemen die erforderliche Genauigkeit einer quantitativen Messung wie des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und des Radio Immuno Assays (RIA). Der RIA bringt die genauesten Messergebnisse der Progesteronkonzentration im Blutplasma (van Klaveren et al. 2001), ist jedoch aufgrund der benötigten radioaktiv markierten Antigene in den meisten Laboren ungebräuchlich. Das bei einem RIA benötigte Radioisotop wird beim ELISA durch ein Enzym ersetzt (Gan und Patel 2013) und macht damit dieses Testverfahren zum Standard in den klinischen Laboren. Alternativ kann die Progesteronmessung mit Hilfe eines Enzyme-linked Fluorescence Assays (ELFA) erfolgen. Bei dieser Messmethode wird ein Immuno-Assay mit einer Fluoreszenz-Messung verbunden. Brugger et al. (2011) bestimmten Progesteron aus dem Blutserum von Hündinnen mit dem MiniVidas<sup>®</sup>-Automaten (Fa. Biomerieux) sowie mit einer Messmethode per RIA nach Hoffmann et al. (1973; 1992) und konnten überwiegend vergleichbare Messergebnisse feststellen.

Die Progesteronwerte für die Zeit nach der Ovulation können erhebliche individuelle Unterschiede aufweisen. In der Literatur sind Werte zwischen 15 bis 50 ng/ml (Goodman 2001), 19,1 bis 22,9 ng/ml (Concannon et al. 1975) und 15 bis 90 ng/ml (Johnston et al. 2001) angegeben. Jedoch konnte in allen Literaturquellen ein Abfallen der Progesteronkonzentration ab dem 30. Tag nach der Ovulation gemessen werden.

#### 2.4.      Vaginoskopie

Die Vaginoskopie visualisiert die Morphologie der Vaginalschleimhaut und gibt Hinweise auf den aktuellen Zyklusstand der Hündin (Bostedt 2016). Zur Durchführung werden entweder sterile Röhrenspekula mit Lichtquelle oder eine Endoskopie-Einheit mit starrem Endoskop



benutzt. Vor der Durchführung der Vaginoskopie sollte die Vulva und der perivulväre Bereich mit feuchten und trockenen Zellstofftüchern gesäubert werden. Vor der Einführung des Spekulum wird dieses angewärmt und gleitfähig gemacht. Die Rima vulvae wird mit den Fingern einer Hand gespreizt und das Vaginoskop zunächst in einem Winkel von ca. 70° nach dorsal in das Vestibulum vaginae vorgeschoben. Sobald der Hymenalring passiert ist, schlägt der Genitaltrakt merklich nach kranio-ventral um und das Vaginoskop kann nun nahezu waagrecht nach vorne geschoben werden (Bostedt 2016).

Dem Verlauf des Östrogenspiegels folgend, ändert die Vaginalschleimhaut ihr Erscheinungsbild im Laufe des Sexualzyklus erheblich (Concannon 2011; Bunck und Günzel-Apel 2016). Die Vaginalmukosa wird auf folgende Aspekte hin untersucht:

- Ödematisierung der Schleimhaut: Größe und Form der Schleimhautfalten  
(rund und aufgequollen, eckig und runzelig)
- Farbe der Schleimhaut (rosa, blassrosa, blass, fleckig)
- Feuchtigkeit der Schleimhaut (feucht, trocknend, trocken/pappig)
- Weite des Vaginallumens

Im Anöstrus sind die Schleimhautfalten der Vagina flach und dünn (England und von Heimendahl 2010). Die Schleimhaut zeigt sich geringgradig feucht und rosa. Im beginnenden Proöstrus kommt es durch die ansteigende Östrogenkonzentration zu einer Ödematisierung der Vaginalmukosa, die Schleimhautfalten stellen sich gering- bis mittelgradig gequollen und feucht dar (England und von Heimendahl 2010). Schreitet der Proöstrus weiter fort, quellen die Schleimhautfalten hochgradig auf und verschließen das Vaginallumen. Die Farbe der Schleimhaut geht von anfangs rosa zu blassrosa bis weiß im späten Proöstrus über (Bunck und Günzel-Apel 2016). Im Östrus quellen die Vaginalfalten rasch ab, da die Ödematisierung mit dem schnell fallenden Östrogenspiegel kurz vor der Ovulation zurückgeht. Auf den noch großen Primärfalten sind nun kleine Sekundärfältchen erkennbar (Wehrend 2010). Die Schleimhaut beginnt abzutrocknen und wird nun endgültig weiß (England und von Heimendahl 2010). Zu der Abtrocknung der Schleimhaut trägt neben der sinkenden Östrogenkonzentration auch der steigende Progesteronspiegel bei (Günzel-Apel et al. 2012). Steht die

Ovulation kurz bevor, nimmt die Ödematisierung der Schleimhautfalten stark ab, diese stellen sich nun eckig dar und das Vaginallumen weitet sich somit zunehmend wieder. Am Übergang zum Metöstrus sind die Schleimhautfalten schlaff, klein und runzelig (England und von Heimendahl 2010). Die Mucosa erscheint zu diesem Zeitpunkt weiß mit rosa Bereichen (Wehrend 2010; England und von Heimendahl 2010). Im Verlauf der Lutealphase verkleinert sich das Vaginallumen auf die gleiche Größe wie im Anöstrus und geht schließlich vom flachen, trockenen und blassrosanen wieder in das flache, blassrosa-feuchte Erscheinungsbild des Anöstrus über (Wehrend 2010).

### 2.5. Vaginalzytologie

Die exfoliative Vaginalzytologie ist eine einfach durchzuführende und minimalinvasive Untersuchungsmethode, die Auskunft über die Gestalt der Vaginalmukosazellen gibt (Wehrend 2010). Zur Probenentnahme eignet sich ein Wattetupfer mit ausreichend langem Stiel, der mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet ist (Johnston et al. 2001; Wehrend et al. 2013).

Angefeuchtete Tupfer werden von den Hündinnen besser toleriert und ergeben bis zu eineinhalbmal zellreichere Ausstriche im Vergleich zu trockenen (Wehrend et al. 2013; Röttger 2010). Ein Spreiz- oder Röhrenspekulum kann zur Probengewinnung eingesetzt werden, ist aber nicht zwingend notwendig, um aussagekräftige Abstriche zu gewinnen (Johnston et al. 2001). Beim Einführen des Tupfers ohne Spekulum ist darauf zu achten, nicht die Fossa clitoridis zu berühren, um keine keratinisierten Zellen von dort aufzunehmen (Johnston et al. 2001). Die Abstriche sollten vom Vaginaldach mit einer drehenden Bewegung entnommen werden. Proben aus dem Bereich des Vaginalbodens können Verunreinigungen oder zu wenig Epithelzellmaterial enthalten (Wehrend et al. 2013). Nach der Entnahme werden die Wattetupfer in zwei Bahnen auf einem Objektträger ausgerollt; ein schmierendes Abstreichen würde das Zellbild zerstören (Bell et al. 1973). Wichtig in der Beurteilung eines Vaginalzellabstriches ist die Unterscheidung von verhornten Epithelzellen von den übrigen Zellen. Den Goldstandard für die Färbung eines Vaginalzellausstrichs stellt die Papanicolaou-Färbung dar (Brunner 1983). Sie färbt verhornte Zellen azidophil und unverhornte basophil an (Suter et al. 2012). Da diese aber einen erheblichen Zeit- und Materialaufwand bedeutet, sind Schnellfärbeverfahren wie Haema Schnellfärbung Diff-Quick® oder Hemacolour® die praxisnähere und schnelle-

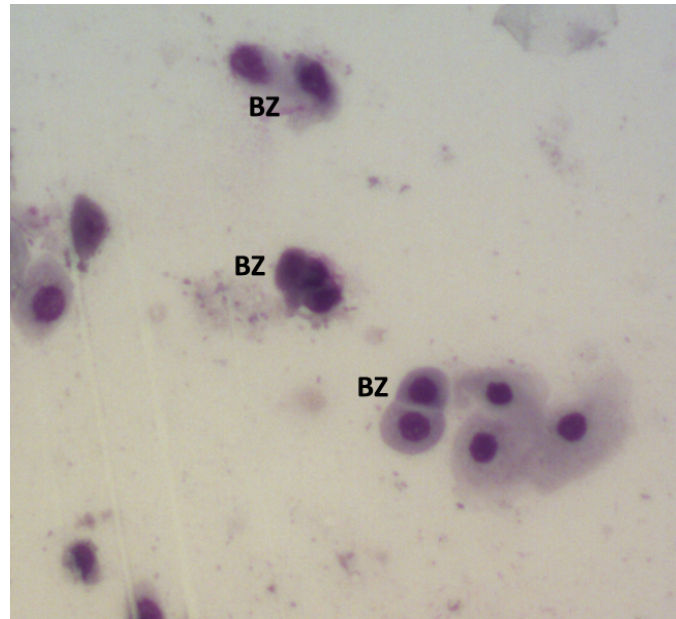
re Lösung (Brunner 1983; Concannon und Digregorio 1986). Trotz ihrer Einfachheit bieten die Schnellfärbemethoden eine ausreichend gute Differenzierung der Epithel- und Blutzellen (Johnston et al. 2001). Schnell durchführbare und dennoch polychromatische Färbemethoden stellen die Färbungen nach Kubicek oder Harris-Schorr dar (Wehrend et al. 2013). Sie sind in wenigen Minuten durchzuführen und erlauben eine ähnlich genaue Zelldifferenzierung wie die Färbung nach Papanicolaou (Suter et al. 2012). Die abgeschilferten (exfolierten) Mucosazellen geben je nach ihrer Art und Anzahl den charakteristischen Stand des Zyklus wieder (Christie et al. 1972; Post 1985). Der typische Auf- und Abbau der Zellschichten des Vaginal-epithels ist durch den momentanen Östrogenspiegel im jeweiligen Zyklusstadium bedingt.

Findet man im Anöstrus nur drei bis vier Zellschichten, so weist das Vaginalepithel durch die östrogeninduzierte Proliferation im Östrus bis zu 20 Zellschichten auf (Christie et al. 1972; Wehrend et al. 2013). Im Laufe des Zyklus ändern sich die Zellen in ihrer Größe, Form und der Gestalt ihres Zellkerns. Weiterhin werden der Verhornungsgrad, die Beschaffenheit des Zellrandes und das Auftreten von Begleitzellen in die Diagnosestellung mit einbezogen.

### Zellen des physiologischen Vaginalausstrichs:

#### **Basalzellen**

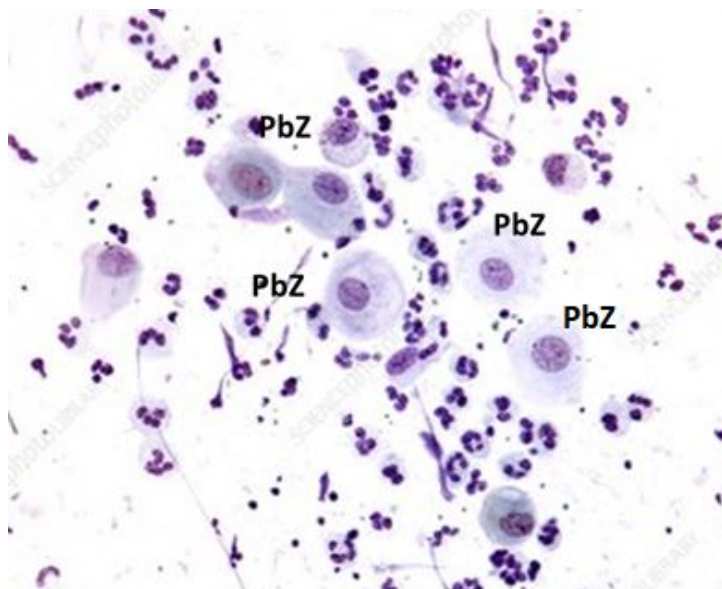
Basalzellen (Abb. 4) sind die Ursprungszellen aller darauffolgenden Zellformen (Johnston et al. 2001; Christie et al. 1972). Sie sind verhältnismäßig klein, rund bis ovoid und besitzen einen randständigen Zellkern (Wehrend et al. 2013; Dreier 1975).



**Abb. 4:** Vaginalzytologisches Präparat, BZ: Basalzellen (© Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik der LMU München)

### **Parabasalzellen**

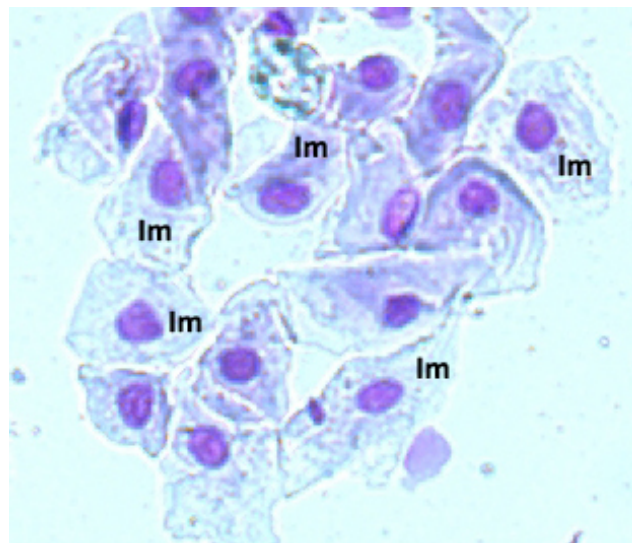
Parabasalzellen (Abb.5) ähneln mit ihrer runden bis ovoiden Gestalt den Basalzellen, sind aber mit 15 bis 25 µm ein wenig größer als diese und besitzen den im Verhältnis zum Zytoplasma größten Zellkern (Christie et al.1972; Johnston et al. 2001; Wehrend et al.2013)



**Abb. 5:** Vaginalzytologisches Präparat, PbZ: Parabasalzellen (© Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik der LMU München)

### Intermediärzellen

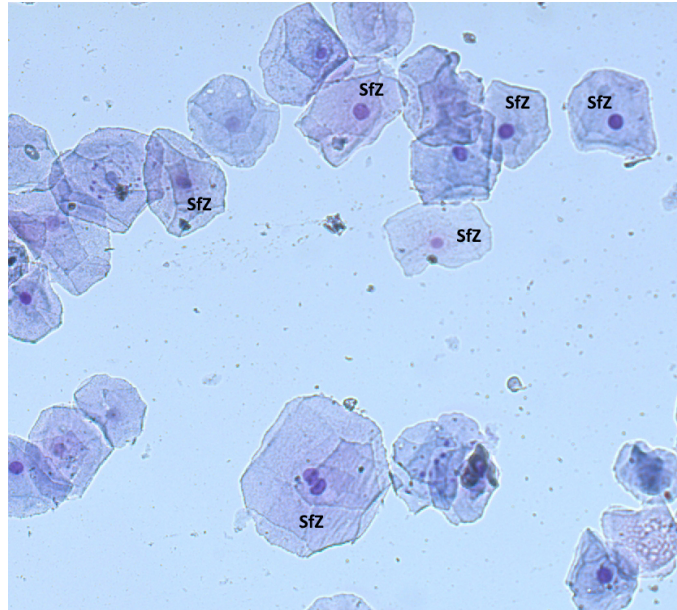
Die Intermediärzellen (Abb. 6) variieren stark in ihrer Größe. In der Literatur wird teilweise zwischen kleinen, 20µm bis 30µm (Johnston et al. 2001) und bis zu 60µm (Wehrend et al. 2013) großen Intermediärzellen unterschieden. Sie erscheinen abgerundet bis polygonal-eckig mit großem, peripher gelegenen Zellkern (Dreier 1975).



**Abb. 6:** Vaginalzytologisches Präparat, Im: Intermediärzellen (© Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik der LMU München)

### Superfizialzellen

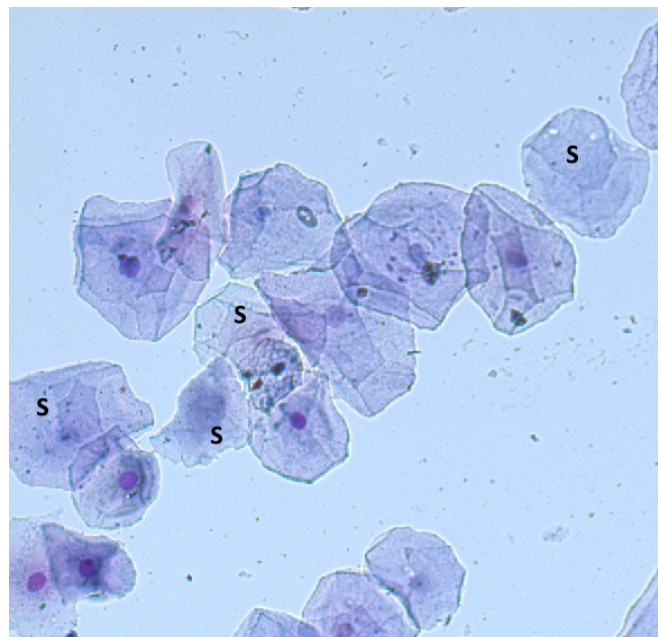
Superfizialzellen (Abb. 7) sind mit 30 bis 75µm die größten Zellen des Vaginalzellausstriches der Hündin (Johnston et al. 2001). Sie besitzen einen kleinen, pyknotischen Zellkern, ihre Ränder erscheinen unregelmäßig und an den Ecken oft umgeschlagen (Christie et al. 1972). Anders als bei den Parabasal- und Intermediärzellen setzt bei den Superfizialzellen bereits die Verhornung der Zellen ein, welche ihr Absterben und die Transformation zu Schollen bedeutet. In Abhängigkeit von ihrem bereits vorhandenen Keratinisierungsgrad färben sich die Superfizialzellen mit heterogener Färbelösung noch basophil oder bereits azidophil an (Wehrend et al. 2013).



**Abb. 7:** Vaginalzytologisches Präparat, SfZ: Superficialzellen (© Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik der LMU München)

### Schollen

Schollen (Abb. 8) sind vollständig verhornte, abgestorbene Superficialzellen (Wehrend et al. 2013; Dreier 1975; Christie et al. 1972). Sie besitzen keinen Zellkern mehr und zeigen ein klares Zytoplasma.



**Abb. 8:** Vaginalzytologisches Präparat, S: Schollen (© Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik der LMU München)

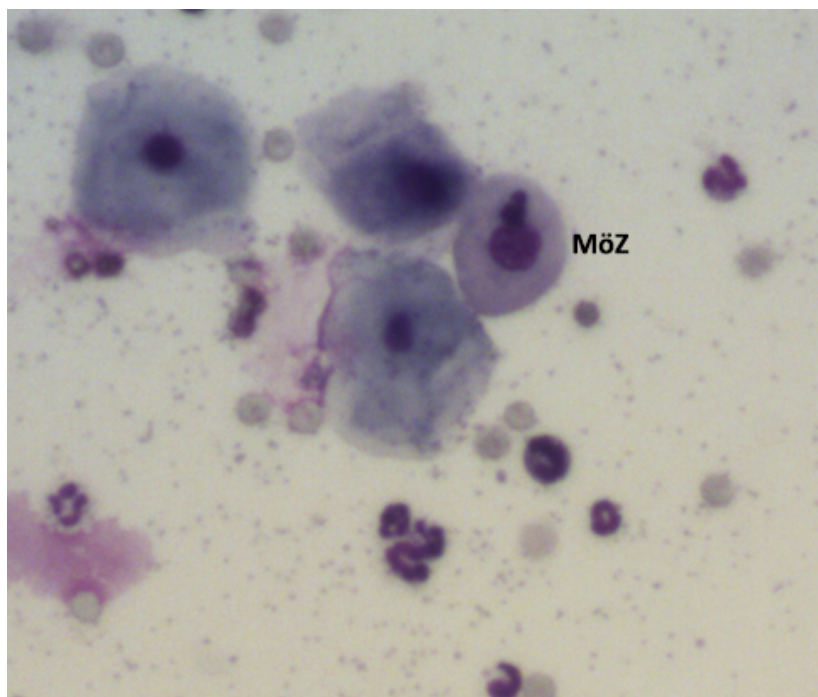


## Erythrozyten

Erythrozyten finden sich physiologischerweise in der Follikelphase (Proöstrus) im Zellausstrich wieder, da die Diapedesisblutungen zu diesem Zeitpunkt auftreten (Dreier 1975). Jedoch können sie im Einzelfall auch bis in den Metöstrus hineingefunden werden (Wehrend et al. 2013).

## Metöstruszellen

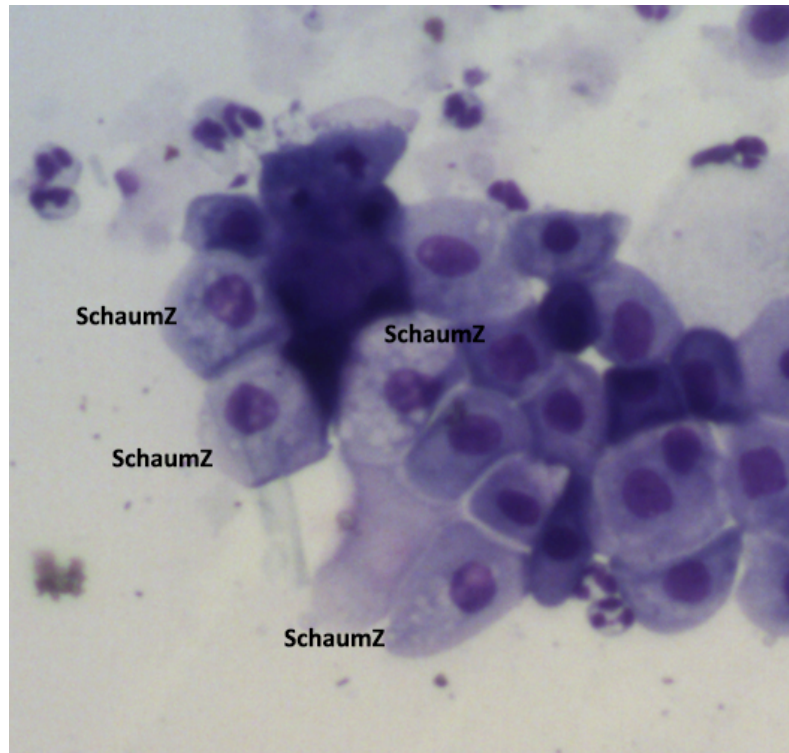
Bei Metöstruszellen (Abb. 9) handelt es sich um große Intermediärzellen bzw. modifizierte Parabasalzellen, in deren Zellplasma neutrophile Granulozyten erkennbar sind. Sie kommen nahezu ausschließlich im Metöstrus vor (Wehrend et al. 2013).



**Abb. 9:** Vaginalzytologisches Präparat, MöZ: Metöstruszelle (© Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik der LMU München)

### Schaumzellen

Schaumzellen (Abb. 10) ähneln in ihrer Morphologie den Metöstruszellen; sie treten im Metöstrus als Intermediärzellen auf, bei denen Vakuolen im Zytoplasma zu sehen sind (Rieck und Kratzheller 1955). Wright und Parry (1989) sprechen von modifizierten Parabasalzellen.



**Abb. 10:** Vaginalzytologisches Präparat, SchaumZ: Schaumzelle (© Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik der LMU München)

### Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten treten typischerweise in großer Zahl im frühen Metöstrus auf, können aber auch vereinzelt im frühen Proöstrus zu sehen sein (Bunck und Günzel-Apel 2016). Im Metöstrus beseitigen sie Zelldetritus und sonstige zellige Bestandteile, die während des Zellzerfalls im Wechsel zur Gelbkörperphase auftreten.

### Veränderungen des zytologischen Ausstrichs während des Zyklus



Im Anöstrus findet man insgesamt nur wenige Zellen im Ausstrich. Basal- und Parabasalzellen dominieren das zytologische Bild (Dreier 1975; Concannon und Digregorio 1986). Häufig ist der Ausstrich von Zelldébris, welcher sich als inhaltsloser, polymorph gestalteter und eosinophil angefärbter Fleck darstellt durchsetzt. Erythrozyten und Neutrophile Granulozyten findet man nur selten im anöstrischen Zellaustrich. Beginnt im Proöstrus die östrogeninduzierte Proliferation des Vaginalepithels und damit die Vervielfältigung aller Zellschichten, treten neben den Basalzellen, Parabasalzellen und neutrophilen Granulozyten nun vermehrt Intermediärzellen und im weiteren Verlauf Superfizialzellen auf (Dreier 1975; Concannon und Digregorio 1986). Erythrozyten sind meistens begleitend im Zellbild zu finden. Im späten Proöstrus wird das zytologische Bild nahezu vollständig von Superfizialzellen dominiert. Im Östrus ist die Keratinisierung und Abschilferung der Mukosazellen am ausgeprägtesten (Wright und Parry 1989). Finden sich mehr als 90% Superfizialzellen im Ausstrich, kann vom Beginn des Östrus gesprochen werden (Johnston et al. 2001). Im Laufe des Östrus nimmt der Anteil an Schollen immer mehr zu (Christie et al. 1972). Da in dieser Zyklusphase massenhaft Zellen abgeschilfert werden, können im mikroskopischen Bild typischerweise „Nester“ aus zusammengelagerten Epithelzellen erkannt werden (Olson et al. 1984). Der Ausstrichhintergrund ist zu diesem Zeitpunkt klar (Concannon und Digregorio 1986). Sechs bis sieben Tage vor der Ovulation bis sechs bis sieben Tage danach dominieren Superfizialzellen und Schollen beinahe zu 100% das zytologische Bild (Concannon und Digregorio 1986). Der Anstieg des Progesterons und gleichzeitige Abfall des Östrogens während und nach der Ovulation induziert eine verstärkte Desquamation der oberen Zellschichten des Vaginalepithels (Bunck und Günzel-Apel 2016). Dieses „zytologische Ende“ der Läufigkeit und damit der Beginn des Metöstrus können durch einen markanten Wechsel des Zellbildes bestimmt werden (Holst und Phemister 1974). Er findet innerhalb von sieben bis neun Tagen (Concannon und Digregorio 1986) nach dem LH-Peak statt. Innerhalb von 24 bis 48 Stunden sinkt der Anteil der Superfizialzellen und Schollen um bis zu 50% ab, während tiefere Zellen wie kleine Intermediärzellen und Parabasalzellen wieder im Bild auftauchen (Post 1985; Concannon und Digregorio 1986; Perez et al. 2005). Ab diesem Zeitpunkt können vermehrt neutrophile Granulozyten im Ausstrich beobachtet werden (Post 1985; Johnston et al. 2001). Von neutrophilen Granulozyten infiltrierte Epithelzellen werden in diesem Zyklusabschnitt teilweise auch als „Metöstruszellen“ beschrieben (Wehrend et al. 2013; Post 1985). Dieser zytologische Umschwung bedeutet auch, dass die befruchtungsfähige Phase der Oozyten vorüber ist und somit keine Chance mehr auf eine Konzeption durch einen natürlichen Deckakt besteht (Bunck und Gün-

zel-Apel 2016).

Die Zytologie ist ein Werkzeug, das dazu geeignet ist, die momentane Zyklusphase zu erfassen, jedoch nicht um den genauen Zeitpunkt der Ovulation bestimmen zu können. Der Zeitraum der maximalen Verhornung der Epithelzellen unterliegt starken individuellen Schwankungen, sodass alleine aus dem Zellbild kein allgemeingültiger Rückschluss auf den Ovulationszeitpunkt gezogen werden kann (Wehrend et al. 2013).

### 2.5.      Sonografische Untersuchung der Ovarien

Um zusätzliche Informationen über die Ovarmorphologie zu erhalten, eignet sich die sonografische Untersuchung der Eierstöcke. Da die Ovarien ihre Morphologie dem Zyklus folgend stetig ändern, ist die sonografische Beurteilung des Zyklusstandes nur durch einen erfahrenen Untersucher sinnvoll (Davidson und Baker 2009). Die dünnwandigen, hypoechogenen, flüssigkeitsgefüllten Follikel im Proöstrus und Östrus werden im Verlauf der Lutealphase zu dickwandigeren Corpora lutea, welche zu Beginn aber immer noch mit hypoechogener Flüssigkeit gefüllt sind (Davidson und Baker 2009). Die morphologischen Veränderungen während des Proöstrus, Östrus und in der Zeit nach der Ovulation sind gering und daher nur mit geschultem Auge erkennbar. Der ovarielle Blutfluss stellt ein weiteres Indiz der bevorstehenden Ovulation dar (Bergeron et al. 2013). Per Farbdoppler konnte ein signifikanter Unterschied des Blutflusses im Ovargewebe vom Tag des präovulatorischen LH-Peaks zum ersten Tag nach dem LH-Peak gemessen werden. Somit konnten die Autoren den präovulatorischen LH-Peak nachweisen und eine Vorhersage der baldigen Ovulation machen (Bergeron et al. 2013). Der ovarielle Blutfluss kann darüber hinaus auch im Metöstrus per Powerdoppler gemessen werden und durch ihn zwischen trächtigen und nicht trächtigen Hündinnen differenziert werden (Polisca et al. 2013).

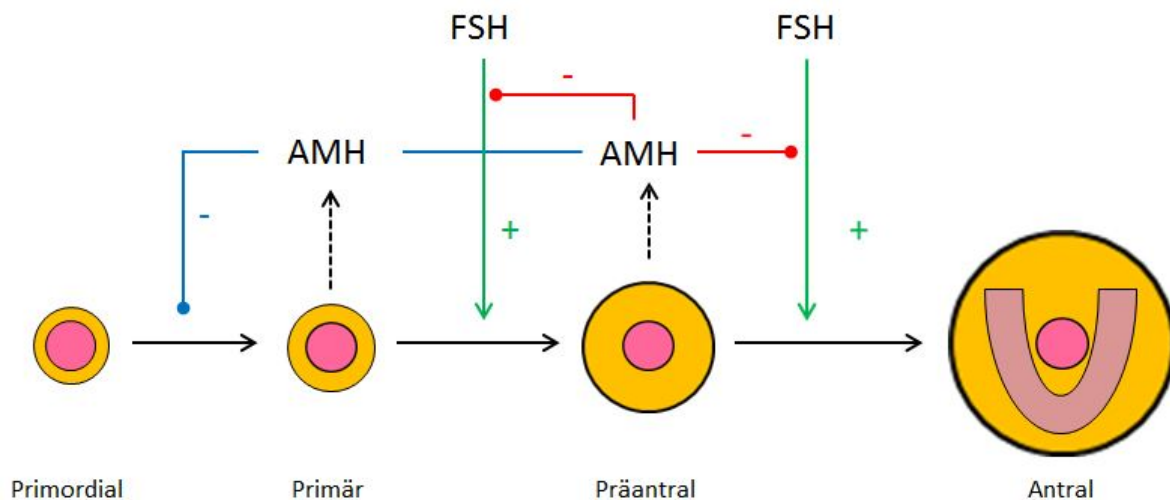
### 3.      **Das Anti-Müller-Hormon**

#### 3.1.      Synthese und Wirkung des Anti-Müller-Hormons

Das Anti-Müller-Hormon (AMH), auch als Müllerian inhibiting substance (MIS) oder Müllerian inhibitory factor (MIF) beschrieben, wird bei Männern und männlichen Säugetieren (nachgewiesen bei Hengst, Hund, Bulle, Eber, Schafbock, Ziegenbock, Ratte) in den Sertolizellen des embryonalen Hodens gebildet (Rey et al. 2000; Banco et al. 2012; Tran et al. 1987; Schnorr und Kressin 1989). Das AMH ist ein Proteinhormon aus der Familie der Transformierenden Wachstumsfaktoren oder Transforming-Growth-Factors- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Durlinger et al. 1999). Es gehört damit zu den Zytokinen zählenden Signalmolekülen. Bevor sich die Geschlechtsorgane des Embryos entwickeln, besteht bei beiden Geschlechtern eine indifferente Anlage mit jeweils einem Wolff'schen und einem Müller'schen Gang (Schnorr und Kressin 1989). Mit der Wirkung des fetalen Testosterons entwickelt sich beim männlichen Embryo der Wolff'sche Gang zu den inneren männlichen Geschlechtsorganen, während sich der Müller'sche Gang unter der Einwirkung des AMHs zurückbildet. Es bleibt lediglich ein rudimentärer Rest, die sogenannte Uterovagina masculina zurück (Schnorr und Kressin 1989). Beim ausgewachsenen Mann und männlichen Säugetier spielt AMH in der Regulation der Testosteronproduktion in den Leydigzellen der Hoden eine Rolle. Da bei der Entwicklung der Geschlechtsanlagen der Frau und des weiblichen Tieres kein Testosteron wirkt und das fetale Ovar noch kein AMH produziert, entwickeln sich die Müllerschen Gänge zu Eileiter, Uterus und kranialer Vagina (Schnorr und Kressin 1989; Hirobe et al. 1992). Studien an weiblichen Nagetieren haben ergeben, dass die AMH-Produktion im Ovar beginnt, sobald sich die Granulosazellen des Primärfollikels aus den Epithelzellen des Primordialfollikels bilden (Durlinger et al. 1999). Bei Frauen und Hündinnen ist die Expression des AMHs in den Granulosazellen der Präantral- und kleinen Antralfollikeln am höchsten (Weenen et al. 2004; Durlinger et al. 2002; van Rooij et al. 2002; Nagashima et al. 2016). Diese Follikelstadien werden im Proöstrus von Hündinnen verstärkt gebildet (England et al. 2009). Die AMH-Bildung nimmt in den darauffolgenden Entwicklungsstufen des Follikels linear ab (Weenen et al. 2004; Durlinger et al. 2002; van Rooij et al. 2002; Nagashima et al. 2016).

Während der fertilen Lebensjahre hemmt AMH die Entwicklung von zu vielen Primordialfollikeln zu weiteren follikulären Entwicklungsstufen durch einen negativen Feedback-Mechanismus auf den Primordialfollikelpool, (Abb. 12) (Durlinger et al. 1999, 2002).

AMH verzögert auf diese Weise die Erschöpfung des Primordialfollikelpools. Weiterhin unterdrückt AMH die Sensitivität des wachsenden Präantralfollikel gegenüber FSH, um die Selektion und Reifung zu vieler Follikel zu verhindern, (Abb. 11) (Durlinger et al. 2001).



**Abb. 11:** Wirkungen des AMH im Ovar. Das AMH wird in den Primärfollikeln, Präantral- und kleinen Antralfollikeln gebildet. Es hemmt die Entwicklung zuvieler Primordialfollikel (blau) und hemmt die Sensitivität des Präantralfollikel gegenüber FSH (rot) (aus Durlinger et al. 2002).

### 3.2. Nachweismethoden

Mittels Immunhistochemie wurde AMH schon Anfang der 90er Jahre in Hundeembryos nachgewiesen (Meyers-Wallen et al. 1991). Als Immunhistochemie bezeichnet man die Untersuchung von Gewebeproben mit immunchemischen Methoden, beispielsweise die Anfärbung von Zell- oder Gewebestrukturen mit an Antikörper gekoppelten Farbstoffen (Lang 2006). Dabei unterscheidet man direkte Färbungen, wobei der primäre Antikörper mit einem Marker gekoppelt ist, und indirekte Färbungen, bei der ein mit dem Marker gekoppelter sekundärer Antikörper gegen den primären eingesetzt wird. Das Prinzip der Nachweisreaktion basiert auf einer Affinität von Antikörpern zu einer speziellen Gewebeart. Eine bestimmte Eigenschaft des Gewebes (Epitop) löst dann eine Antikörper-Antigen-Reaktion aus. An den Antikörper wird vor der Zugabe zu dem zu untersuchenden Präparat mittels Kopplung ein bestimmtes Nachweissystem (Detektionssystem) angehängt, welches die Gegenwart und Aktivität der

Antikörper anzeigen soll (Lang 2006). Um AMH nachzuweisen, wird z.B. der Avidin-Biotin-Komplex (ABC) verwendet (Banco et al. 2012). Ziel ist es letztlich, ein ausreichend starkes Färbesignal im Areal des Epitops zu erreichen, während die nicht zum Epitop gehörenden Gewebeabschnitte ungefärbt bleiben sollen (Lang 2006).

Ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren (Assay), welches z.B. Hormone im Blutserum misst. Wie der Radioimmunoassay (RIA) gehört auch der ELISA zur Gruppe der Immunassay-Verfahren, basiert aber nicht auf einer Radioaktivitätsmessung, sondern auf einer enzymatischen Farbreaktion (Kindt 2007). Das nachzuweisende Antigen wird über einen Erstantikörper an eine Mikrotiterplatte adsorptiv gebunden und angereichert, ein Enzym-gekoppelter Zweitantikörper führt zur Reaktion eines Farbstoffsubstrates, dessen Farbintensität mit einer Standardkurve verglichen wird (Kindt 2007). Für den AMH-Nachweis im Blutserum von Hunden wurden anfänglich humane ELISA-Assays verwendet (Diagnostic Systems Laboratory, Immunotech, Beckmann Coulter) (Holst 2017). Pir Yagci et al. (2016) verglichen ein humanes (Beckman Coulter, AMH- Gen II, USA) und ein canines (East BioPharm, China) ELISA-Kit und stellten die Überlegenheit des humanmedizinischen Kits fest, da das von ihnen angewandte canine Kit den Abfall des AMHs nach Kastration nicht korrekt erkannte. Seit kurzem steht zur AMH-Messung im Serum ein weiteres kommerziell erhältliches canines ELISA-System zur Verfügung (Ansh Labs, Webster, Texas, USA) (Turna Yilmaz et al. 2015; Themmen et al. 2016). Canine ELISA-Assays messen durch ihre höhere Sensitivität durchweg höhere AMH-Konzentrationen als die humanen ELISA-Kits (Themmen et al. 2016; Yilmaz et al 2015; Axnér et al. 2015). Die Sensitivität eines humanen ELISA-Kits für den Einsatz bei Hündinnen lag bei Alm & Holst (2018) nur bei 88%. Laut Pir Yagci (2016) mangelt es derzeit dennoch an der Standardisierung der AMH-Referenzbereiche der von verschiedenen Labors angebotenen caninen Testkits.

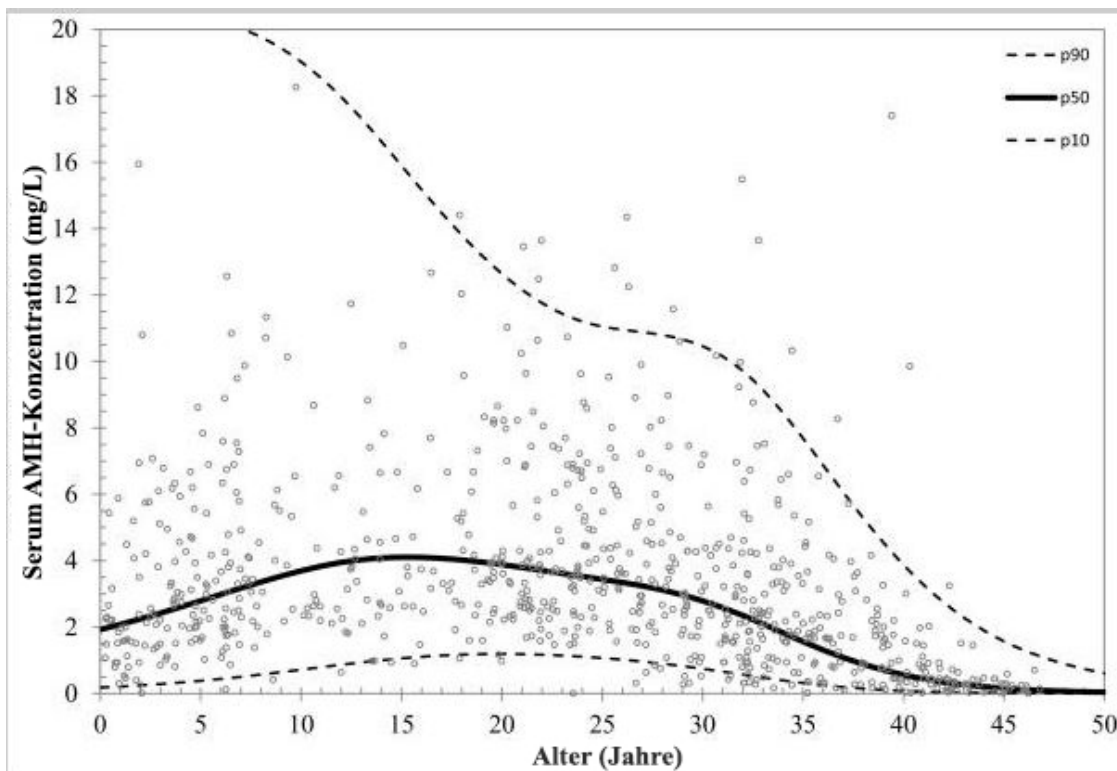
### 3.3.      Konzentrationsverlauf des Anti-Müller-Hormons im Sexualzyklus

Studien bei Frauen ergaben stets große interindividuelle Unterschiede der AMH-Konzentrationen während der Sexualzyklen (Lie Fong et al. 2012; Guzel et al. 2017). In der Veterinärmedizin dagegen zeigten Forschungsarbeiten bei verschiedenen Tierarten konstantere Konzentrationsverläufe. Almeida et al. (2011) fanden während des gesamten Zyklus von Stuten einen verhältnismäßig gleichmäßigen Verlauf des AMHs mit einem Mittelwert von  $0,96 \pm 0,08$  ng/ml. Eine Studie an Kühen zeigte ebenfalls einen überwiegend konstanten Verlauf des AMHs über den Reproduktionszyklus mit mittleren Konzentrationen von  $0,09 \pm 0,003$  ng/ml (El-Sheikh Ali et al. 2013). Eine weitere Studie untersuchte den Konzentrationsverlauf des AMHs bei Kühen während eines Zeitraumes von 3 Monaten vor bis 3 Monate nach der Geburt eines Kalbes (Nabenishi et al. 2017). Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass sich der Konzentrationsverlauf während dieses Zeitraumes nicht signifikant änderte; jedoch erhebliche individuelle Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Tieren bestanden. Nagashima et al. (2016) untersuchten den Verlauf des Anti-Müller-Hormons bei fünf Beagle-Hündinnen am Übergang vom Anöstrus zur Läufigkeit. Ziel dieser Arbeit war es, die Nützlichkeit des AMHs als möglichen Indikator für eine bevorstehende Läufigkeit zu untersuchen. Die Autoren stellten einen signifikanten Anstieg der AMH-Konzentration im Zeitraum von 30 Tagen bis vier Tagen vor dem LH-Peak fest. Ab Tag vier vor dem LH-Peak fiel die Konzentration wieder bis auf das Basalniveau des Anöstrus oder darunter ab.

Beim Mann ist eine hohe Sekretion von AMH bis in die Pubertät nachzuweisen (Rey et al. 1993). Der Anstieg der Androgene und die damit verbundene Reifung der Sertolizellen scheint die Ursache dafür zu sein, dass die Sekretion von AMH im Verlauf der Pubertät und danach abnimmt (Rey et al. 1993). Bei Rüden konnte AMH immunhistochemisch im Hoden von Feten, Neugeborenen und Welpen bis zu einem Alter von maximal 45 Tagen nachgewiesen werden (Banco et al. 2012). Claes et al. (2013) stellten bei gesunden Hengsten im Alter von acht bis 22 Jahren unterschiedliche jahreszeitlich fluktuierende AMH-Konzentrationen im Blutserum fest. In Hoden von adulten, gesunden Hengsten ab einem Alter von drei Jahren konnte immunhistochemisch kein AMH mehr nachgewiesen werden (Ball et al. 2008). Im Blutserum hingegen konnte AMH auch bei den adulten Tieren bestimmt werden (Ball et al. 2008; Claes et al. 2013).

## 3.3.1 Einfluss des Alters auf die AMH-Konzentration im Serum

Bei jungen Mädchen ist das AMH bis zur Pubertät teilweise erniedrigt oder überhaupt nicht messbar (Hudson et al. 1990; Lee et al. 1996). Erst ab der zweiten Lebensdekade und dem Eintritt in die Pubertät steigt die AMH-Konzentration messbar an (Hudson et al. 1990). Lie Fong et al. (2012) konnten bei Frauen ein AMH-Maximum mit durchschnittlich 15,8 Jahren nachweisen. AMH blieb bis zum Alter von 25 Jahren auf einem konstant hohen Niveau um danach mit steigendem Alter stetig abzusinken (Lie Fong et al. 2012; Visser et al. 2006); (Abb. 12). Zum Ende der fruchtbaren Lebensphase wird die Messung von AMH wieder zunehmend schwieriger (Freeman et al. 2012; Sowers et al. 2008). AMH fällt in der vierten Lebensdekade im Mittel zehn Jahre vor der Menopause (Freeman et al. 2012) und in der fünften Dekade fünf bis sechs Jahre vor der Menopause (Sowers et al. 2008) unter die Nachweisgrenze ab. Frauen mit einer geringen altersspezifischen Serum-AMH-Konzentration kommen früher in die Menopause als Frauen mit höheren altersspezifischen AMH-Konzentrationen (Depmann et al. 2016; 2018).

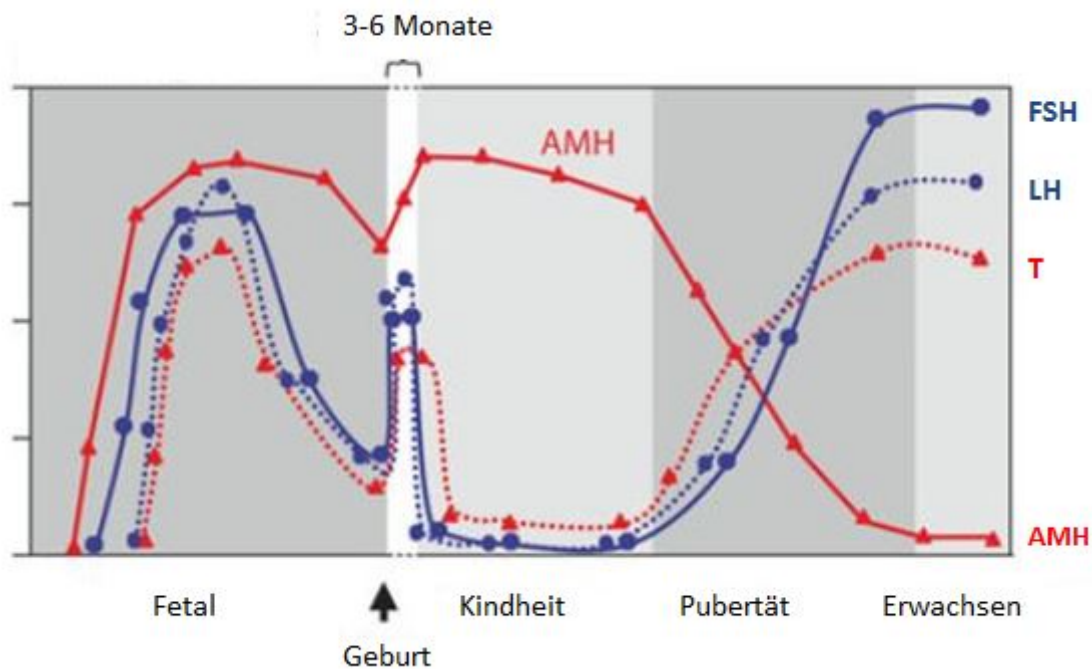


**Abb. 12:** Invers korrelierte Serum-AMH-Konzentrationen bei Frauen steigenden Alters. P90 = obere Referenzgrenze, P10 = untere Referenzgrenze, P50 = Medianwert (aus Lie Fong et al. 2012).

Der Zusammenhang des Alters mit der AMH-Konzentration wurde in der Veterinärmedizin bereits bei weiblichen Katzen, Hunden und Mäusen untersucht. Eine Studie an intakten Katzen verschiedenen Alters fand die höchsten AMH-Konzentrationen bei den jüngsten Tieren mit sechs Monaten und stellte weiterhin fest, dass der Konzentrationsverlauf mit steigendem Alter der Katzen stetig abnahm (Axnér und Ström Holst 2015). Der gleiche Zusammenhang zwischen Alter und AMH-Konzentration konnte vorher bereits bei weiblichen Mäusen festgestellt werden (Kevenaar et al. 2006). Hollinshead et al. (2017) maßen bei 155 Hündinnen unterschiedlicher Größe und verschiedenen Alters jeweils zum Zeitpunkt des Östrus die AMH-Konzentration. Auch in dieser Studie schien die AMH-Konzentration bei Hündinnen über einem Jahr mit fortschreitendem Alter zu sinken: Mit jedem Lebensjahr sank die mittlere AMH-Konzentration um 0,5 ng/ml. Schwieriger hingegen scheint die Messung des AMHs bei jungen Hündinnen vor der Geschlechtsreife zu sein (Place et al. 2011). In jener Studie fanden sich einige intakte Hündinnen zwischen drei und sechs Monaten, deren AMH-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Yilmaz et al. (2015) dagegen konnten für alle Hündinnen zwischen vier und sechs Monaten AMH-Konzentrationen messen. Die Sensitivität des verwendeten Messverfahrens scheint demnach bei jungen Hündinnen eine Rolle zu spielen.

Bei männlichen Embryos wird AMH am Ende der fünften Schwangerschaftswoche von Frauen in den Sertolizellen gebildet (Grinspon und Rey 2010). Auf gleichbleibend hohem Niveau während der Schwangerschaft, fällt Gonadotropin und damit AMH und Testosteron in der ersten Woche nach der Geburt ab, um in der zweiten Woche wieder anzusteigen und die ersten drei bis sechs Lebensmonate auf hohem Niveau zu bleiben (Abb. 13) (Forest et al. 1974). Während der präpubertären Lebensphase ändert sich wenig an der hohen AMH-Konzentration; die Sertolizellen des Jungen wachsen und durchlaufen prämatüre Entwicklungsstadien (Grinspon und Rey 2010). Die Reaktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonadotropin-Achse zu Beginn der Pubertät steigert die Produktion von Androgenen und führt damit zur Reifung der Sertolizellen (Pasqualini et al. 1981). Das Wachstum und die AMH-Produktion derselben stagniert somit (Abb. 13) (Rey et al. 2003).





**Abb. 13:** Schematische Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs im Leben des Mannes. Gonadotropine: LH, FSH, T: Testosteron (aus Grinspon und Rey 2010).

Bei Rüden scheint das Alter keinen signifikanten Einfluss auf die Serum-AMH-Konzentration zu haben (Holst und Dreimanis 2015). Die Rüden mit pathologischen Veränderungen der Hoden besaßen zwar durchweg erhöhte AMH-Serumkonzentrationen; diese schienen aber im Vergleich zur Kontrollgruppe lediglich von der Erkrankung an sich und nicht vom Alter abzuhängen.

### 3.3.2. Einfluss der Körpergröße auf die AMH-Konzentration im Serum

In einer neueren Studie an Hündinnen wurden erstmals Hinweise darauf gefunden, dass die mittlere Serum-AMH-Konzentration in direktem Zusammenhang mit der Körpergröße stehen könnte (Hollinshead et al. 2017). Kleinere Rassen wiesen durchschnittlich höhere AMH-Konzentrationen auf als größere. So besaß die Gruppe der kleinen Hündinnen (< 12 kg) AMH-Werte im Bereich von 5,6 bis 24,2 ng/ml und die der mittelgroßen Hündinnen (13 – 25 kg) zwischen 4,3 und 23,7 ng/ml. Die Gruppe der großen Hündinnen (26 – 40 kg) lag zwischen 4,3 und 21,0 ng/ml und letztlich die der Riesenrassen (> 40 kg) bei 1,75 bis 15,6 ng/ml.

Innerhalb der jeweiligen Gruppen bekamen die Hündinnen mit der höchsten AMH-Konzentration die größten Würfe.

#### **4.      Klinische Anwendungsmöglichkeiten beim Menschen und Haustier**

##### **4.1.      Bestimmung des Kastrationsstatus**

AMH wird ausschließlich von den Sertoli-Zellen des Hodens und den Granulosazellen des Ovars produziert (Visser et al. 2006; Durlinger et al. 1999). Somit gibt der Nachweis von AMH im Blut einen Rückschluss auf das Vorhandensein von Keimdrüsen. Place et al. (2011) konstituierten bereits den Nutzen von ELISA-Testkits, um eine Aussage über den Kastrationsstatus von Hündinnen und Katzen machen zu können: Gerade bei Hündinnen und Katzen mit unbekannter Vorgeschichte, aus dem Ausland oder in Tierheimen, ist die Frage nach dem Kastrationsstatus von Bedeutung (Place et al 2011). Ovargewebe kann konventionell durch eine klinische Untersuchung, per Vaginalzytologie, mit einem GnRH-Stimulationstest, durch eine LH-, Progesteron- oder Östradiolbestimmung oder eine diagnostische Laparatomie diagnostiziert werden (Wallace 1991; Rohlertz et al. 2012; Feldman und Nelson 2001). Östradiol- sowie Progesteronmessung und Vaginalzytologie haben den Nachteil, dass sie nur während bestimmten Zyklusphasen aussagekräftige Ergebnisse liefern (Rohlertz et al 2012). Eine explorative Laparatomie stellt einen erheblichen, invasiven Eingriff für das Tier dar (Rohlertz et al. 2012). Ein GnRH-Stimulationstest liefert aussagekräftige Ergebnisse, umfasst jedoch eine Buserelin-Injektion und mindestens zwei Blutentnahmen (Axnér und Ström Holst 2015). Der Nachweis von Ovargewebe per AMH-Messung kann hingegen mit nur einer einzigen Blutentnahme durchgeführt werden (Turna Yilmaz et al. 2015). AMH ist als Marker endokrin aktiven Ovargewebes zu jedem Zeitpunkt des Zyklus nachweisbar (Turna Yilmaz et al. 2015).

Bisher wurde AMH mit verschiedenen ELISA-Testkits aus der Human- und Veterinärmedizin im Serum von Hunden und Katzen bestimmt. Die Serum-AMH-Konzentrationen von intakten Hündinnen wurden von Place et al. (2011) mit einem humanmedizinischen ELISA-Kit gemessen und befanden im Bereich von 0,10 bis 0,41 ng/ml gemessen, wohingegen alle kastrierten Hündinnen unter dem Cut-Off-Wert von 0,09 ng/ml lagen. Eine andere Studie nutzte ein canines ELISA-Kit und kam zu dem Ergebnis, dass alle vorberichtlich kastrierten Hündinnen unter der Konzentration von 1,1 ng/ml AMH lagen (Themmen et al. 2016). Die

mittlere AMH-Konzentration der intakten Hündinnen lag in dieser Studie bei  $3,9 \pm 2,7$  ng/ml. Eine weitere Studie konnte für kastrierte Hündinnen eine AMH-Konzentration von  $0,28 \pm 0,09$  ng/ml und für intakte Hündinnen  $4,26 \pm 0,82$  ng/ml messen (Turna Yilmaz et al. 2015). Die Überlegenheit eines humanmedizinischen ELISA-Testkits (AMH Gen II Elisa, Beckman Coulter) für die Anwendung bei Hündinnen gegenüber einem caninen Testkit (east BioPharm, China) wurde bereits untersucht (Pir Yagci et al. 2016). Alm und Holst (2018) konnten mit demselben humanen Testkit 51 von 52 (98%) der kastrierten Hündinnen richtig erkennen, wohingegen nur 64 von 73 (88%) der intakten Hündinnen richtig diagnostiziert wurden.

Axnér und Ström Holst (2015) führten eine Studie an Katzen durch, in welcher mit Hilfe der Serum-AMH-Konzentration der vorher bekannte Kastrationsstatus von weiblichen und männlichen Katzen verifiziert wurde. Die Werte aller kastrierten Katzen und Kater lagen unter der Nachweisgrenze von 0,14 ng/ml. Die Werte der intakten weiblichen Katzen lagen zwischen 1,3 und 19 ng/ml und die Kater zwischen 4,8 und 81,3 ng/ml. Der verwendete, humane ELISA-Test (AMH Gen II ELISA; Beckman Coulter) zeigte eine Sensitivität und Spezifität von 100% für die Erkennung von Gonadengewebe (Axnér und Ström Holst 2015).

#### 4.2. Diagnose des Ovarrestsyndroms

Das Ovarrest-Syndrom (ORS) bezeichnet Ovargewebe, das nach einer unvollständigen Kastration wieder endokrin aktiv wird (Wallace 1991; Günzel-Apel et al. 2012). Bei der Hündin können neben wiederauftretender zyklischer Läufigkeit oder Scheinträchtigkeit tumorös entartete Ovarreste zu Dauerläufigkeit, Pyometra und östrogenbedingter Knochenmarkssuppression führen (Günzel-Apel et al. 2012). Im Tierkörper verbliebenes, endokrin aktives Ovargewebe kann mit den gleichen Methoden wie bei der Frage nach dem Kastrationsstatus identifiziert werden. Pir Yagci et al. (2016) beprobten in ihrer Arbeit Hündinnen mit Verdacht auf ORS. Sie kamen mit einem humanmedizinischen ELISA-Kit zu AMH-Messwerten, die zwischen denen von kastrierten und unkastrierten Hündinnen lagen ( $0,195 \pm 0,04$  ng/ml). Das in derselben Studie vergleichend angewandte ELISA-Testverfahren für Hunde kam zu einem insgesamt viel höheren Mittelwert ( $4,11 \pm 2,35$  ng/ml). Dieser ähnelt allerdings den Konzentrationsbereichen der Studie von Turna Yilmaz et al. (2015) mit  $4,40 \pm 1,09$  ng/ml für die Gruppe der Hündinnen mit ORS. Turna Yilmaz et al. (2015) und Place et al. (2011) konnten die Hün-

dinnen mit ORS anhand der AMH-Werte zwar kaum von den intakten Hündinnen ( $4,26 \pm 0,82$  ng/ml) unterscheiden, jedoch zeigte sich bei beiden ein signifikanter Unterschied zwischen den kastrierten und den ORS-Gruppen. Die AMH-Werte von Katzen mit ORS ( $0,48 - 0,52$  ng/ml) aus der Studie von Place et al. (2011) überschritten sich weder mit den Werten der intakten ( $0,55 - 0,98$  ng/ml) noch der kastrierten ( $0,18 - 0,33$  ng/ml) Tieren. Diese Studie nutzte für die AMH-Messung ein humanes ELISA-Kit (active MIS/AMH ELISA kit; DSL, Cergy-Pontoise, Frankreich).

#### 4.3.      Das Anti-Müller Hormon als Indikator der ovariellen Reserve

In der Humanmedizin wird AMH unter anderem dazu verwendet, die ovarielle Reserve von Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch zu bestimmen. Durch Bestimmung der AMH-Konzentration werden Rückschlüsse auf die Ovarreserve, d.h. das Potential der Ovarfunktion zu einem bestimmten Zeitpunkt gezogen (Visser et al. 2006). Die AMH-Konzentration im Blutserum reflektiert die Qualität und die Anzahl der vorhandenen Primordialfollikel (Hansen et al. 2011; Lie Fong et al. 2012). Die Serum-AMH-Konzentration sinkt mit steigendem Lebensalter der Frau (Visser et al. 2006; Lie Fong et al. 2012; Guzel et al. 2017). Die Serum-AMH-Konzentration wird bei Frauen daher als Indikator des ovariellen Alterns verwendet (Visser et al. 2006). AMH erwies sich auch bei der Frau als besserer Indikator für ein möglicherweise schlechtes Ergebnis einer induzierten Superovulation als das Alter, die FSH- oder die Inhibin-Konzentration (Broer et al. 2011).

Auch in veterinärmedizinischen Forschungen wurde bereits bei Mäusen eine positive Korrelation zwischen der Serum-AMH-Konzentration und der Anzahl der Primordialfollikel festgestellt (Kevenaar et al. 2006). In der Rinderzucht ist die Ansprechbarkeit auf eine Superovulation bei Kühen mit unterschiedlichen AMH-Werten experimentell untersucht worden (Souza et al. 2015; Rico et al. 2012). Der AMH-Wert im Serum reflektiert die Anzahl der kleinen Antralfollikel, welche die Zielzellen der Auslösung einer Superovulation sind (Monniaux et al. 2010). Somit kann anhand der Serum-AMH-Konzentration die mögliche Anzahl produzierbarer Embryonen bei Donorkühen vorhergesagt werden (Monniaux et al. 2010). Allerdings zeigten in-vivo-Versuche keine tatsächliche Korrelation zwischen hohen AMH-Werten und entstandenen Embryonen bei Holstein-Friesien-Kühen (Vernunft et al. 2015). Rico et al. (2012)

definierten in ihrer Arbeit einen Cut-Off-Wert für AMH, um Kühe mit zu erwartender niedriger Embryonenanzahl nach GnRH-Stimulation aus Zuchtprogrammen auszuschließen.

Hündinnen innerhalb dergleichen Größen- und Gewichtsklasse mit höheren AMH-Werten im Östrus brachten größere Würfe zur Welt als Hündinnen mit niedrigeren AMH-Konzentrationen (Hollinshead et al. 2017). Gemittelt stieg die Wurfgröße um 0,3 Welpen pro 0,1 ng/ml AMH. Diese Zahlen müssen jedoch scheinbar in Zusammenhang mit dem Alter der Hündin gedeutet werden: Hündinnen unter 4 Jahren hatten durchweg mehr erfolgreiche Trächtigkeiten ( $81,1\% \pm 46,1\%$ ) als jene über 4 Jahre ( $64,6\% \pm 32,7\%$ ).

#### 4.4. Das Anti-Müller-Hormon als Marker für Granulosazelltumoren

In der Humanmedizin sind erhöhte AMH-Konzentrationen im Blut von Frauen als Tumormarker für Granulosazelltumoren (GCT) beschrieben (Rey et al. 2000; Rey et al. 1996). Nach Entfernung der Granulosazelltumoren sanken die AMH-Werte der Patientinnen wieder auf Basalniveau ab.

In der Veterinärmedizin führten El-Sheikh Ali et al. (2013) eine Studie an Rindern durch und konnten bei allen Tieren mit Granulosazelltumoren einen signifikant erhöhten mittleren AMH-Wert ( $3,59 \text{ ng/ml}$ ) als bei der Gruppe der gesunden Tiere ( $0,07 \text{ ng/ml}$ ) feststellen. Dieser war ebenso höher als bei der Vergleichsgruppe mit Ovarzysten ( $0,13 \text{ ng/ml}$ ). Eine Woche nach operativer Entnahme der tumorös entarteten Ovarien sank die AMH-Konzentration wieder auf Werte zwischen  $0,04$  und  $0,05 \text{ ng/ml}$ .

Bei Stuten mit GCT fanden sich ebenso erhöhte mittlere AMH-Konzentrationen ( $1901,4 \pm 1144,6 \text{ ng/ml}$ ) gegenüber Tieren mit normalem Zyklus ( $0,96 \pm 0,08 \text{ ng/ml}$ ) oder in der Trächtigkeit ( $0,72 \pm 0,05 \text{ ng/ml}$ ) (Almeida et al. 2011). Auch in dieser Studie sank die AMH-Konzentration nach operativer Entfernung der Granulosazelltumoren kontinuierlich ab. Signifikant erhöhte AMH-Werte konnten bei 11 Stuten mit diagnostiziertem Granulosazelltumor gemessen werden; wohingegen signifikant erhöhtes Inhibin nur bei 8 von 11 und erhöhtes Testosteron nur bei 5 von 11 Tieren festgestellt werden konnte (Almeida et al. 2011).

In einem Fallbericht über eine Katze mit GCT wies diese ebenfalls einen erhöhten AMH-Serumwert ( $5,7 \text{ ng/ml}$ ) auf, welcher zwei Monate nach erfolgter Kastration wieder unter

0,04 ng/ml absank (Heaps et al. 2017).

Auch bei Hündinnen konnten signifikant erhöhte AMH-Konzentrationen bei Tieren mit GCT festgestellt werden (Walter et al. 2018). Betroffene Hündinnen hatten AMH-Konzentrationen zwischen 1,12 und  $\geq 23$  ng/ml, die signifikant über denen von Hündinnen lagen, die keinen GCT aufwiesen. Der beschriebene Cut-Off-Wert von 0,99 ng/ml hatte eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 94.44%, um GCT zu identifizieren und von anderen Neoplasien wie epitheliale Tumoren, Dysgerminomen und Sarkomen sowie von Hündinnen mit Follikel- und Gelbkörperzysten abzugrenzen.

### 4.5 Das Anti-Müller-Hormon als Marker für Sertolizelltumoren

Ähnlich wie beim Granulosazelltumor bei weiblichen Tieren kann AMH bei Männern und männlichen Tieren zur Identifizierung von Sertolizelltumoren (SCT) genutzt werden (Grinspon und Rey 2010; Ball et al 2008; Banco et al. 2010; Holst und Dreimanis 2015). Im Gegensatz zu immunhistochemischen Studien, bei denen ein Nachweis von AMH in tumorös entarteten SCT nicht oder kaum möglich war (Rey et al. 2000), kann der Nachweis im Blutserum sehr gut als Marker verwendet werden. So konnte bei Männern AMH im Serum bis ins Erwachsenenalter gemessen werden (Grinspon und Rey 2010). Mittels ELISA konnten abnormal hohe AMH-Serumkonzentrationen auch bei adulten Rüden und Hengsten mit SCT festgestellt werden (Banco et al. 2010; Holst und Dreimanis 2015; Ball et al. 2008).

Erwartet man bei neoplastischer Entartung von Keimdrüsen eigentlich stark erhöhte Hormonkonzentrationen, zeigte die Diagnostik bei Männern mit SCT via Immunhistochemie ein unerwartetes Ergebnis: Nur noch in wenigen der neoplastisch entarteten Sertolizellen ließ sich AMH nachweisen (Rey et al. 2000). Laut der Autoren konnte bei nur wenigen auf die Immunhistochemie reagierenden Zellen von einem SCT ausgegangen werden. Der immunhistochemische Nachweis von AMH wird auch im Hodengewebe von adulten Rüden und Hengsten mit zunehmendem Alter problematisch (Banco et al. 2012; Ball et al. 2008). Vermutlich dedifferenzieren sich Sertolizellen im Vorgang der neoplastischen Entartung und durchlaufen prä-mature Entwicklungsstadien, in welchen sie wieder mehr AMH produzieren (Banco et al. 2012).

Die Ergebnisse der oben genannten Studien an Rüden lassen durch signifikant erhöhte AMH-Konzentrationen in Zusammenhang mit klinischen Symptomen, wie Feminisierung und Alopie, auf das Vorliegen eines SCT schließen. Auch bei anderen testikulären Tumoren, wie Seminomen oder Leydigzelltumoren oder bei entzündlichen Hodenpathologien konnten höhere AMH-Konzentrationen als bei gesunden, intakten Rüden im Serum gemessen werden (Holst und Dreimanis 2015).

### 4.6      Das Anti-Müller-Hormon als Indikator für Kryptorchismus

Die Messung des AMH-Spiegels wird in der Humanmedizin dazu verwendet, das Vorhandensein von Hodengewebe bei präpubertären Jungen mit Verdacht auf Kryptorchismus zu beweisen beziehungsweise auszuschließen (Lee et al. 1997). Da bei Jungen mit Kryptorchismus AMH-Konzentrationen ähnlich derer von Jungen mit abgestiegenen, normal entwickelten Hoden gemessen wurden, konnten durch den AMH-Nachweis Patienten mit Kryptorchismus von denen mit Anorchie unterschieden werden (Lee et al 1997).

Ball et al. (2008) konnten AMH immunhistochemisch in den Sertolizellen bei kryptorchiden Hengsten im Alter von einem Tag bis zu vier Jahren nachweisen; wohingegen in Sertolizellen der normal kastrierten Hengste über zwölf Monaten immunhistochemisch kein AMH-Nachweis mehr gelang. Claes et al. (2013) konnten signifikant höhere durchschnittliche AMH-Konzentrationen im Serum bei kryptorchiden als bei intakten oder kastrierten Hengsten feststellen.

Kitahara et al. (2012) maßen Serum-AMH bei vollständig kastrierten, intakten und einseitig kryptorchiden Japanese-Black-Kälbern, bei welchen der abgestiegene Hoden 14 Tage vor den Messungen konventionell entfernt wurde. Die Gruppe der einseitig kryptorchiden Tiere zeigte signifikant höhere AMH-Serumkonzentrationen als die der kastrierten. Somit konnte das Vorhandensein von abdominalem Testikulargewebe zweifelsfrei bewiesen werden.

In einer Studie an Rüden verschiedener Toy-Rassen wurden die AMH-Konzentration bei intakten, kastrierten und bilateral kryptorchiden Tieren ab einem Alter von 6 Monaten gemessen (Gharagozlou et al. 2014). Es wurde festgestellt, dass die Gruppe der kryptorchiden Rüden im Gegensatz zu den kastrierten signifikant höhere mediane Serum-AMH-Konzentration besa-

ßen. Sie unterschied sich jedoch nicht signifikant von den intakten Rüden. In einer weiteren Studie wurden hingegen signifikant erhöhte AMH-Serumkonzentrationen bei kryptorchiden Rüden im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe beschrieben (Hornakova et al. 2017). Es erscheint somit wahrscheinlich, dass das AMH ein guter Indikator für das Vorhandensein von funktionalem Testikulargewebe ist, unabhängig davon, ob sich dieses nun abdominal oder skrotal befindet (Gharagozlou et al. 2014; Hornakova et al. 2017).



### III Untersuchungsgut, Material und Methoden

#### 1. Voruntersuchungen Teil 1: Bestimmung des Kastrationsstatus mit Hilfe der Serumkonzentration von AMH

##### 1.1. Untersuchte Hündinnen

Für diesen ersten Teil der Untersuchungen wurden insgesamt 19 vorberichtlich kastrierte Hündinnen unterschiedlicher Rassen einbezogen. Dabei handelte es sich um sechs Mischlinge, einen Zwergspitz, einen Australian Sheperd, zwei Rhodesian Ridgebacks, eine Deutsche Dogge, zwei Deutsch Drahthaar und jeweils eine Hündin der Rasse Yorkshire Terrier, eine Englische Bulldogge, einen Golden Retriever, einen Dobermann, einen Collie und einen Chihuahua. Die Hündinnen waren zwischen einem und 14 Jahren alt ( $\bar{x}$  7,8 Jahre) und wogen zwischen 1,4 kg und 59,0 kg ( $\bar{x}$  25,6 kg). Alle Hündinnen waren Patienten der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die kastrierten Hündinnen wurden in einem Zeitraum von 12 Jahren bis einem Jahr vor der Probennahme an der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik kastriert: 12 Jahre (n=1), 11 Jahre (n=2), 10 Jahre (n=1), 9 Jahre (n=1), 6 Jahre (n=1), 4 Jahre (n=1), 3 Jahre (n=1), 2 Jahre (n=4), 1 Jahr (n=7). Die Besitzer der Hündinnen willigten schriftlich in die Nutzung der Patienten für die Untersuchung ein.

Des Weiteren stellten 19 intakte Hündinnen die Vergleichsgruppe zu den kastrierten Hündinnen dieser Voruntersuchung Teil 1 dar. Sie bestand aus sechs Beaglen und sechs FBIs (Foxhound-Boxer-Ingelheimer Labrador) aus dem Bestand des Lehrstuhles für Tierernährung und Diätetik der Ludwig-Maximilians-Universität München. Weiterhin wurde jeweils eine Hündin der Rasse Labrador, Neufundländer, Rottweiler, Deutscher Schäferhund, Border Collie, weißer Schäferhund und Französische Bulldogge aus dem Patientengut der Chirurgischen und Gynäkologischen Tierklinik mit in die Gruppe einbezogen. Die Hündinnen waren zwischen einem und vier Jahren alt ( $\bar{x}$  3,3 Jahre) und wogen zwischen 10,0 kg und 27,0 kg ( $\bar{x}$  25,6 kg). Das gesamte Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 Abs. 1 des Deutschen Tierschutzgesetzes unter AZ 55.2-1-54-2532-111-2016 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

#### 1.2. Versuchsaufbau: Vergleich kastriert - intakt

In diesen Voruntersuchungen Teil 1 wurden die AMH-Konzentrationen von den 19 intakten, gesunden Hündinnen verschiedener Zyklusstadien mit denen von 19 kastrierten, gesunden Hündinnen verglichen. Die Blutproben der intakten Hündinnen wurden in folgenden Zyklusphasen abgenommen: Anöstrus (n = 10), Metöstrus (n = 3), Proöstrus (n = 3), Östrus (n = 3). Durch die äußere gynäkologische Untersuchung, Vaginalzytologie und Progesteronmessung wurden die Zyklusphasen der intakten Hündinnen bestimmt. Der genaue Ablauf der Hormonmessungen ist in Kapitel 4.4. dargestellt.

#### 1.3. Statistische Auswertung der Daten

Für die Ermittlung der Grenzwerte der Diagnosen „kastriert“ und „intakt“ wurde eine ROC-Kurven-Analyse durchgeführt. Die Signifikanz der Konzentrationsunterschiede wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant festgelegt.

## **2. Voruntersuchungen Teil 2: Bestimmung der Halbwertszeit des AMH im Serum nach Kastration**

#### 2.1. Untersuchte Hündinnen

Für die Voruntersuchungen Teil 2 standen acht Hündinnen aus dem Patientengut der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik zur Verfügung, von denen vier nach der Kastration für mehrere Tage stationär blieben. Dabei handelte es sich jeweils um eine Hündin der Rasse Englische Bulldogge, Rhodesian Ridgeback, Golden Retriever, Dobermann, Deutsch Drahthaar, Collie, kleiner Münsterländer und Chihuahua. Die Hündinnen waren zwischen vier und 14 Jahre (Ø 9,75 Jahre) alt und wogen zwischen 5,0 und 40,0 (Ø 25,7) Kilogramm.

#### 2.2. Versuchsaufbau: Halbwertszeit des AMH im Serum

Die Halbwertszeit des AMH im Serum nach erfolgter Ovariohysterektomie wurde anhand der acht Hündinnen dieser Voruntersuchung exemplarisch untersucht. Alle Hündinnen befanden sich zum Zeitpunkt der Operation im Metöstrus. Bei allen Hündinnen wurden Blutproben am Tag der Operation und zehn Tage später beim Fäden ziehen gewonnen. Bei den vier stationären Patienten wurden zusätzlich 24, 48 und 72 Stunden nach der Kastration Blutproben gewonnen. Der genaue Ablauf der Hormonmessungen ist in Kapitel 4.4. dargestellt.

### **3. Voruntersuchungen Teil 3: Bestimmung der AMH-Serumkonzentration bei Hündinnen in Abhängigkeit vom Kastrationszeitpunkt**

Für diesen dritten Teil der Voruntersuchungen wurden alle kastrierten Hündinnen aus den Teilen 1 und 2 der Vorversuche (n=27) einbezogen. Die AMH-Konzentrationen der bereits seit mindestens einem Jahr kastrierten Hündinnen aus Vorversuch Teil 1 wurden mit denen aus Vorversuch Teil 2, welche zehn Tage nach Kastration gemessen wurden, statistisch ausgewertet. Hierzu wurden die Konzentrationen der bereits seit einem bis zu zwölf Jahren kastrierten Hündinnen aus Teil 1, und die Konzentrationen an Tag 10 nach der OP der Hündinnen aus Teil 2 andererseits verwendet.

#### 3.1. Statistische Auswertung der Daten

Nach ROC-Kurvenanalyse wurde ein Cut-Off-Wert für die Diagnose „kastriert“ für Hündinnen, welche bereits seit mindestens zehn Tagen kastriert waren, berechnet.

#### **4. Hauptstudie: Konzentrationsverlauf des AMH über den Reproduktionszyklus**

##### **4.1. Untersuchte Hündinnen**

Für die Hauptstudie wurden insgesamt 19 intakte Hündinnen des Lehrstuhls für Tierernährung und Diätetik der Ludwig-Maximilians-Universität München eingeschlossen. Sie wurden nach ihrer Rasse in zwei Versuchsgruppen aufgeteilt: Die Versuchsgruppe 1 stellten zehn Beagle-Hündinnen mit einem Alter von einem bis 4 Jahren ( $\bar{x}$  3,4 Jahre) und 10,0 bis 15,0 kg ( $\bar{x}$  11,5 kg) Körpergewicht dar. Die Hündinnen der Versuchsgruppe 2 bestanden aus neun FBIs welche zwischen zwei und fünf ( $\bar{x}$  3,3) Jahre alt waren und ein Körpergewicht von 24,0 bis 28,0 kg ( $\bar{x}$  26,2kg) hatten. Sie wurden in Zweiergruppen oder größeren Gruppen gehalten und mit Wasser ad libitum und kommerziellem Futter versorgt. Alle Hündinnen zeigten mindestens einen physiologischen Zyklus vor Beginn des Versuches und einen während des Versuches. Alle Hündinnen befanden sich in gutem, gesundem Allgemeinzustand.

##### **4.2. Aufbau der Untersuchung**

Um den AMH-Konzentrationsverlauf über einen gesamten Sexualzyklus dokumentieren zu können, wurde zunächst der Zyklusstand jeder Hündin bestimmt. Dies geschah anhand der äußeren gynäkologischen Untersuchung, einer Vaginalzytologie und der Messung von Progesteron im Serum. Nach Bestimmung des aktuellen Zyklusstandes, wurden die Hündinnen in den unter 4.3. genannten Zeiträumen untersucht und Blutproben gewonnen, um einen vollständigen Reproduktionszyklus zu dokumentieren. Im Rahmen jeder Untersuchung wurden 3ml venöses Blut aus der Vena saphena lateralis in 5ml Serumröhrchen (Fa. Sarstedt, Sarstedt) gewonnen. Die Röhrchen wurden für zehn Minuten bei 1600 U/min zentrifugiert (Sigma 2-6E, Fa. Sigma, Steinheim) und der Überstand wurde in 1,5ml Eppendorf-Gefäße (Fa. Eppendorf, Eppendorf) abpipettiert. Die Progesteronbestimmung wurde direkt im Anschluss durchgeführt. Bis zur AMH-Bestimmung wurden die Serumproben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur AMH-Messung wurden die Proben auf Trockeneis gekühlt an die Firma Laboklin, Bad Kissingen verschickt.

#### 4.3. Gynäkologische Untersuchung

Um den aktuellen Zyklusstand einer Hündin zu bestimmen, wurde zu jedem Untersuchungszeitpunkt der äußere Genitalbereich untersucht, ein zytologischer Abstrich der Vaginalschleimhaut genommen und die Progesteronkonzentration gemessen. In den im Rahmen der gynäkologischen Untersuchungen gewonnenen Blutproben wurde zu definierten Zeitpunkten zusätzlich AMH bestimmt. Eine abdominale Ultraschalluntersuchung zur Darstellung von Uterus und Ovarien wurde bei den Hündinnen durchgeführt, bei denen es zu Auffälligkeiten in einer der oben genannten Untersuchungen kam.

Im späten Anöstrus wurden die Hündinnen einmal wöchentlich bis zum Beginn der nächsten Läufigkeit untersucht. Im Proöstrus wurde jede Hündin ein- bis zweimal untersucht. Im Östrus wurde in engmaschigeren Abständen von einem bis vier Tagen untersucht, um den Tag der Ovulation möglichst genau bestimmen zu können. Im Metöstrus wurden die Hündinnen an Tag 28 post ovulationem untersucht. Im mittleren Anöstrus fand die Untersuchung vier bis fünf Monate post ovulationem statt. Die genaue Anzahl der Untersuchungen und die Untersuchungszeitpunkte im Zyklus sind im Anhang in den Tabellen 1 bis 19 für jede Hündin aufgeführt.

Anhand der Befunde der gynäkologischen Untersuchungen, wurden die Zyklusphasen der Hündinnen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt bestimmt. Alle Befunde, sowie die Zyklusphasen wurden im Untersuchungsprotokoll eingetragen. Tabelle 1 zeigt exemplarisch das Untersuchungsprotokoll einer Hündin über den gesamten Untersuchungszeitraum.

##### 4.3.1. Untersuchung des äußeren Genitalbereichs

Die Untersuchung des äußeren Genitalbereichs bestand in der Adspektion und Palpation des Vulvabereiches, der Untersuchung auf das Vorhandensein von Läufigkeitssekret und der Prüfung des Duldungsreflexes. Die erhobenen Befunde wurden im Untersuchungsprotokoll der jeweiligen Hündin festgehalten (Tab. 1). Zunächst wurde die Konsistenz der Vulva optisch und palpatorisch überprüft. Zu Beginn des Proöstrus beginnt die Vulva anzuschwellen und die Konsistenz wird zunehmend praller (Günzel-Apel 2016b). Mit dem Absinken der Östrogenkonzentration im Östrus kommt es zu einer teigigen Konsistenz der Vulva. Zu Beginn des Metöstrus geht die Vulvaödematisierung vollständig zurück und auch im Anöstrus ist sie nicht

ödematisiert (Günzel-Apel 2016b). Der Ödematisierungsgrad der Vulva wurde im Protokoll mit V (-) für nicht ödematisiert, mit V (+) für gering, mit V (++) für mittelgradig und mit V (+++) für hochgradig ödematisiert angegeben. Der erste Tag der Läufigkeit und damit eines neuen Zyklus ist definiert als der erste Tag, an dem blutiger Vaginalausfluss auftritt (Günzel-Apel 2016b). Über die Läufigkeit wird der Vaginalausfluss vom Proöstrus zum Östrus hin aufgrund der abnehmenden Diapedesisblutung weniger und heller (Günzel-Apel 2016b). Im Protokoll wurde die Menge des vaginalen Ausflusses mit A (-) für keinen Ausfluss, mit A (+) für wenig, A (++) für mittelgradigen und A (+++) für viel Ausfluss bewertet. Die Farbe des Ausflusses wurde mit den Abkürzungen „br“ für „blutig-rot“, und „fw“ für „fleischwasserfarben“ angegeben. Zusätzlich wurde der Duldungsreflex überprüft, indem der Bereich seitlich der Vulva mit dem Finger gekrault wurde und die Reaktion in Form von Beiseitelegen der Rute und Kontraktion der Vulva nach dorsal beurteilt wurde (Günzel-Apel 2016b). Die Ausprägung des Duldungsreflexes wurde mit (-) für nicht auslösbar, (+) für leicht auslösbar, (++) für mittelgradig und (+++) für vollständig auslösbar beurteilt.

#### 4.3.2. Vaginalzytologie

Für die Gewinnung der Vaginalzellabstriche wurden vom Verfasser mit physiologischer Kochsalzlösung getränkte, langstielige Wattetupfer (Fa. Heinz Herenz, Hamburg, Deutschland) benutzt. Vor der Einführung eines Tupfers wurde die Vulva mit einem trockenen Zellstofftuch gesäubert. Mit den Tupfern wurden jeweils zwei Schleimhautabstriche vom Vaginaldach unter leichten Drehbewegungen entnommen und auf zwei Objektträgern in jeweils zwei Bahnen ausgerollt. Einer der Objektträger wurde mittels Haema-Schnellfärbung Diff-Quik® - Färbung (Fa. LT-Sys, Berlin, Deutschland), der zweite nach PAPANICOLAOU (Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt (Brunner 1983). Die Ausstriche wurden von zwei erfahrenen Untersuchern (Diplomate ECAR) unter einem Lichtmikroskop (Olympus CX41, Fa. Olympus, Hamburg) mit Hellfeld in 100- bis 400-facher Vergrößerung untersucht. Die in den Ausstrichen vorkommenden Epithel- sowie Blutzellen wurden mit Kürzeln auf dem Untersuchungsprotokoll (Tab. 1) vermerkt und deren Häufigkeit im Ausstrich mit + für vereinzelt, ++ für mittelgradig oder +++ für Haufenbildung notiert. Darüber hinaus wurde bei allen Präparaten der Ausstrichhintergrund mit in die Beurteilung einbezogen. Die Ausstriche wurden anhand des zytologischen Gesamtbildes in die Zyklusphasen Anöstrus, Proöstrus, Östrus oder Metöstrus eingeordnet. Zellausstriche mit insgesamt wenigen, tiefen Zellen wie

Basal- und Parabasalzellen sowie Zelldebris wurden als Ausstriche des Anöstrus gewertet (Dreier 1975; Concannon und Digregorio 1986). Nahm die Anzahl der Epithelzellen deutlich zu, wurde der Austrich dem Proöstrus zugeordnet (Dreier 1975). Parabasalzellen sowie kleine Intermediärzellen kennzeichneten den frühen Proöstrus (Dreier 1975; Concannon und Digregorio 1986). Im weiteren Verlauf einer neuen Follikelphase und damit des Proöstrus wurden kleine und größere Intermediärzellen sowie Erythrozyten sichtbar (Concannon und Digregorio 1986). Der Übergang zum Östrus wurde mit der Abnahme von Erythrozyten, dem Auftreten von Superficialzellen und Schollen definiert (Johnston et al. 2001). Während des Östrus dominierten große Mengen an Superficialzellen und Schollen das zytologische Bild (Johnston et al. 2001). Zum Untersuchungszeitpunkt des Metöstrus wurden insgesamt wieder weniger Zellen, vor allem Intermediärzellen, Metöstruszellen, Schaumzellen und auch neutrophile Granulozyten erwartet (Post 1985; Concannon und Digregorio 1986; Wehrend et al. 2013).

#### 4.4. Hormonanalysen der Serumproben

##### 4.4.1. Progesteronbestimmung

Progesteron wurde in jeder gewonnenen Blutprobe bestimmt. Von jeder Blutprobe wurden umgehend jeweils 200 µl abzentrifugiertes Serum im MiniVidas®-Automat (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich) in der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik untersucht. Die Progesteronmessung erfolgt über einen sogenannten Enzyme Linked Fluorescence Assay (ELFA). Die Übereinstimmung der Ergebnisse des MiniVidas®-Messverfahrens mit RIA-Messungen wurde bereits von Brugger et al. (2011) für Hündinnen validiert und konnte damit als Referenz benutzt werden. Mit dem Anstieg des Luteinisierenden Hormons (LH) steigt Progesteron über 2 ng/ml an. Zum Zeitpunkt der Ovulation werden Progesteronkonzentrationen von 8-10 ng/ml gemessen.

##### 4.4.2 AMH-Bestimmung

Die AMH-Bestimmung erfolgte mittels Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) (Fa. Laboklin®, Bad Kissingen, Deutschland) auf einem Cobas E602 Gerät (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz). Das Testsystem wurde zuvor von Laboklin® für Hunde validiert. Das Patientenserum, ein monoklonaler, von Mäusen gewonnener, biotinylierter AMH-spezifischer Antikörper und ein mit Ruthenium-Komplex markierter Antikörper werden inku-

biert und bilden einen Sandwichkomplex. Nach Zugabe von mit Streptavidin beschichteten Mikropartikeln wird der Komplex über die Biotin-Streptavidin-Interaktion an die feste Phase gebunden. Das Reagenzgemisch wird in eine Messzelle übertragen, in der die Mikropartikel magnetisch an der Elektrodenoberfläche immobilisiert werden. Ungebundene Substanzen werden anschließend entfernt. Durch Anlegen einer Spannung an die Elektrode wird die Chemilumineszenzemission induziert und die optische Dichte mit einem Fotomultiplier, analog zur AMH-Standardkurve, gemessen (Töpfer 2019). Der Intra-Assay Variationskoeffizient liegt zwischen 2,7 und 3,3%. Die untere Nachweisgrenze des AMHs beträgt 0,01 ng/ml, die obere 23 ng/ml.



**Tabelle 1:** Untersuchungsprotokoll „Lotte“

Pro- ben Nr.	Datum	Zy- lus tag	Progest- eron (ng/ml)	Klinischer Befund	Vaginalzytologie	AMH (ng/ml)	Zyklus- phase
<b>20.2.</b>	13.3.2017	-2	nicht gemes- sen	D-, V-, A-	PbZ++, ImZ+, Neutros++, Bakt. ++	1,40	Später Anöstrus
<b>20.3</b>	16.3.2017	1	0,63	D-, V+, A+	PbZ+, ImZ++, Erys++	1,51	Proöstrus
<b>20.4</b>	18.3.2017	3	0,83	D-, V++, A+++ (br)	ZD++, ImZ++, Erys+++	1,40	Proöstrus
<b>20.5</b>	21.3.2017	6	0,93	D+, V+++, A+++ (br)	ImZ+, SFZ++, Schollen+, Erys+++	0,84	Proöstrus
<b>20.6</b>	23.3.2017	8	1,16	D+, V+++, A+++ (br)	SFZ++, Schol- len++, Erys++	0,72	Proöstrus
<b>20.7</b>	25.3.2017	10	3,32	D+, V+, A+(fw)	SFZ++, Schol- len+++, Erys+	0,62	Östrus
<b>20.8</b>	27.3.2017	12	7,10	D+, V+, A(+)	SFZ+, Schollen+++	1,05	Östrus – prä ov.
<b>20.9</b>	29.3.2017	14	20,38	D+, V+, A(+)	SFZ+, Schollen+++	1,30	Östrus – post ov.
<b>20.10</b>	16.4.2017	31	34,90	D-, V-, A-	PbZ++, ZD+, SchaumZ+	0,60	Metöstrus
<b>20.11</b>	27.7.2017	133	< 0,25	D-, V-, A-	PbZ++, ZD++	0,97	Mittlerer Anöstrus

D: Duldungsreflex (+ positiv/ - negativ); V: Schwellung der Vulva (- negativ, + gering, ++ mittel, +++ stark); A: Ausfluss (- negativ, + wenig, ++ mittel, +++ viel); br: Ausfluss-Farbe blutig-rot; fw: Ausfluss-Farbe fleischwasserfarben. PbZ: Parabasalzellen, ImZ: Intermediärzellen, SFZ: Superficialzellen, ZD: Zelldedritus, SchaumZ: Schaumzellen, Neutros: Neutrophile Granulozyten, Bakt.: Bakterien, Erys: Erythrozyten, ov: Ovulation.

#### 4.5. Statistische Auswertung der Daten

Ausgewertet wurden 141 AMH-Werte der 19 Hündinnen über alle Phasen des Sexualzyklus. Berechnet wurde das Referenzintervall in MedCalc ® mit der Nonparametric percentile method (nach CLSI C28-A3). Die Veränderungen der AMH-Werte über den Zyklus wurden mit Hilfe des verallgemeinerten linearen Modells (GLM) und der GEE-Prozedur auf signifikante Unterschiede analysiert. Stetige Anstiege oder Abfälle innerhalb des Zyklus wurden zusätzlich

auf eine signifikante Korrelation der AMH-Konzentrationen mit dem Zeitverlauf mit der Prozedur nach Spearman untersucht.

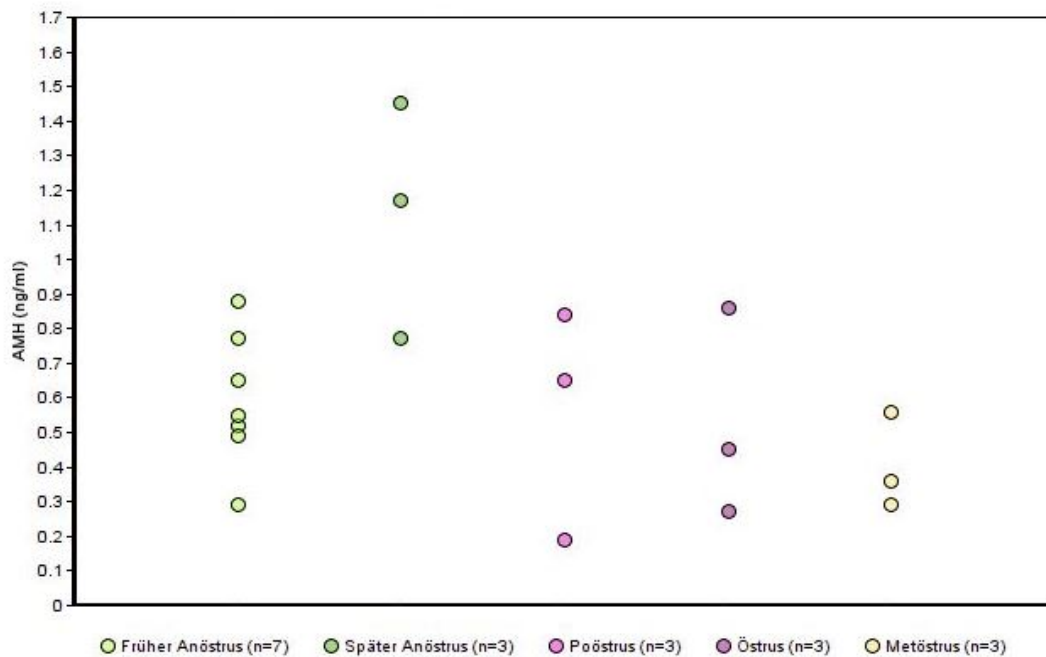
## IV Ergebnisse

### 1. Ergebnisse der Voruntersuchungen Teil 1: Bestimmung des Kastrationsstatus mit Hilfe der Serumkonzentration von AMH

#### 1.1. Intakte Hündinnen

Die 19 intakten Hündinnen wurden mit dem verwendeten ECLIA-Messsystem zu 100% richtig als solche erkannt. Die Hündinnen zeigten AMH-Konzentrationen zwischen min. 0,19 ng/ml und max. 1,45 ng/ml, mit einer mittleren Konzentration von 0,65 ng/ml (Abb. 14, Tab. 2).

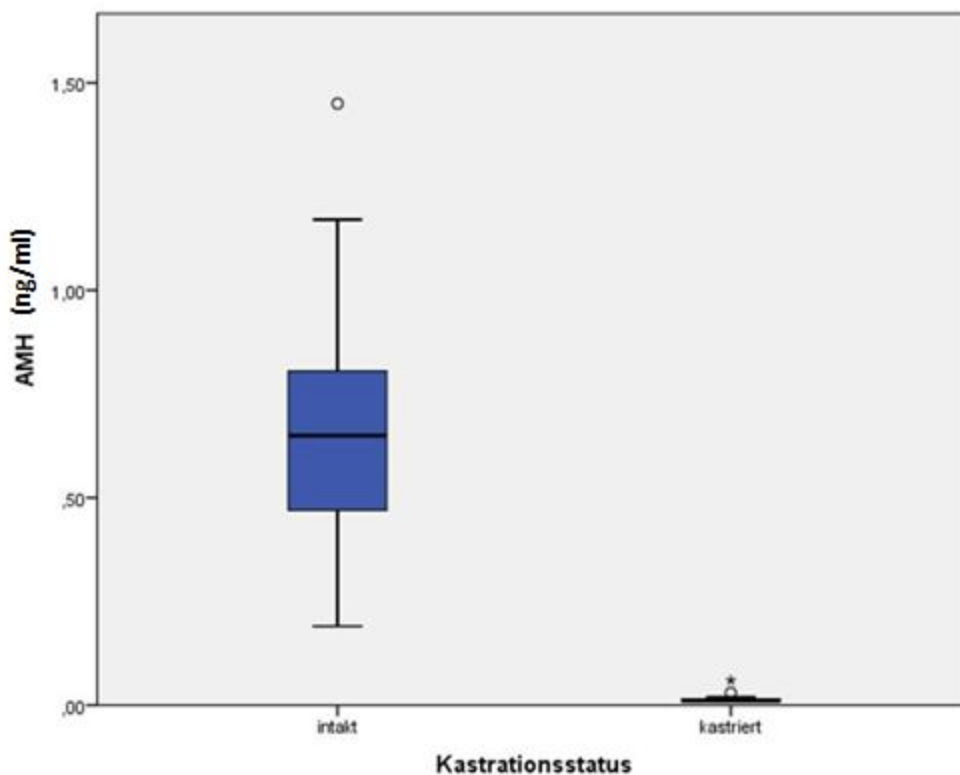
Die sieben Hündinnen im Anöstrus zeigten AMH-Konzentrationen zwischen 0,29 ng/ml und 0,88 ng/ml (hellgrün, Abb. 14). Die höchsten gemessenen Konzentrationen fanden sich bei den drei Hündinnen im späten Anöstrus (dunkelgrün, Abb. 14) mit Werten von 0,77 ng/ml bis 1,45 ng/ml. Eine der drei Hündinnen im Proöstrus (rosa, Abb. 14) hatte mit 0,19 ng/ml die tiefste AMH-Konzentration aller getesteten Hündinnen und der höchste Wert im Proöstrus betrug 0,84 ng/ml. Die drei Hündinnen im Östrus (lila, Abb. 14) lagen zwischen 0,27 ng/ml und 0,86 ng/ml und schließlich wurden bei den drei Hündinnen im Metöstrus (gelb, Abb. 14) Konzentrationen von 0,29 ng/ml bis 0,56 ng/ml gemessen.



**Abb. 14:** Dotplots der AMH-Konzentrationen der intakten Hündinnen. Hellgrün: Früher Anöstrus, Dunkelgrün: Später Anöstrus, Rosa: Proöstrus, Lila: Östrus, Gelb: Metöstrus.

## 1.2. Kastrierte Hündinnen

In der Gruppe der 19 kastrierten Hündinnen wurden mit dem verwendeten ECLIA-Testsystem alle richtig als solche erkannt. Von den Hündinnen, die alle zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme bereits seit einem bis zu zwölf Jahren kastriert waren, wurde bei 18 Tieren eine Serum-AMH-Konzentration von 0,01 ng/ml und bei einer Hündin von 0,02 ng/ml gemessen (Abb. 15, Tab. 2). Die mittlere Konzentration lag bei 0,01 ng/ml.



**Abb.15:** Boxplots der AMH-Konzentrationen von den intakten (n=19) und kastrierten (n=19) Tieren.

Mit dem verwendeten Testsystem konnte ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) der AMH-Konzentrationen zwischen den kastrierten und den intakten Hündinnen festgestellt werden. Es gab keine Überschneidungen der AMH-Konzentrationsbereiche zwischen den beiden Gruppen (Abb. 15). Die Sensitivität des Testsystems in Bezug auf die Diagnose „kastriert“ gegenüber „intakt“ lag bei 100 % (95% Konfidenzintervall = 78,2 - 100,0%). Die Spezifität lag ebenfalls bei 100 % (95% Konfidenzintervall = 97,8 - 100,0%). Nach ROC-Kurvenanalyse ist bei den Hündinnen, welche bereits seit mindestens einem Jahr kastriert wurden, bei einem AMH-Wert unter 0,02 ng/ml davon auszugehen, dass das Tier kastriert war. Alle Hündinnen

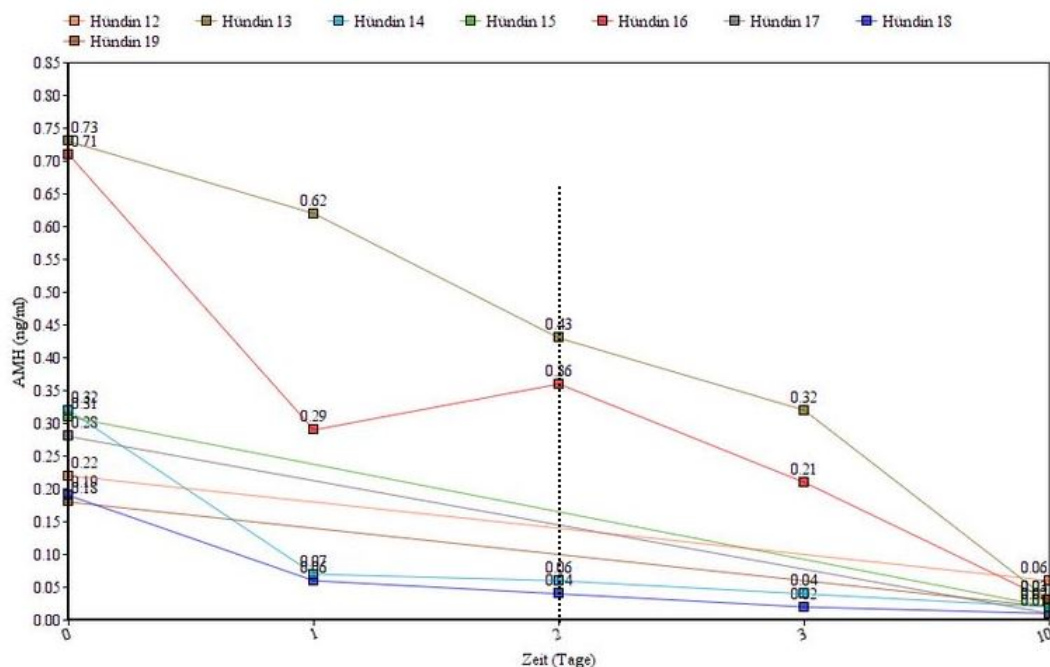
mit höheren AMH-Konzentrationen waren somit intakt. Das Alter, die Größe oder die Rasse der Hündinnen hatte keinen Einfluss auf diese Ergebnisse.

**Tabelle 2:** AMH-Konzentrationen der intakten (n=19) und der kastrierten (n=19) Hündinnen der Voruntersuchung Teil 1

Hündin intakt (Nummer)	AMH (ng/ml)	Hündin kastriert (Nummer)	AMH (ng/ml)
1	0,65	1	0,01
2	0,88	2	0,01
3	0,29	3	0,01
4	0,52	4	0,01
5	1,17	5	0,01
6	1,45	6	0,01
7	0,71	7	0,01
8	0,49	8	0,01
9	0,77	9	0,01
10	0,55	10	0,01
11	0,29	11	0,01
12	0,36	12	0,01
13	0,56	13	0,01
14	0,19	14	0,01
15	0,65	15	0,01
16	0,84	16	0,02
17	0,27	17	0,01
18	0,86	18	0,01
19	0,45	19	0,01

## 2. Voruntersuchungen Teil 2: Bestimmung der Halbwertszeit des AMH im Serum nach Kastration

Bei jeder der acht untersuchten Hündinnen aus der Voruntersuchung Teil 2 sanken die AMH-Konzentrationen im Serum innerhalb der ersten zehn Tage nach der Kastration ab (Tab. 3, Abb. 16). Zu diesem Zeitpunkt nach der Kastration lagen die AMH-Konzentration bei allen Hündinnen bereits bei 0,06 ng/ml oder darunter. Im Einzelnen lagen die AMH-Konzentrationen bei 0,06 ng/ml (n=1), 0,03 ng/ml (n=2), 0,02 ng/ml (n=3) und 0,01 ng/ml (n=2) mit einer durchschnittlichen Konzentration von 0,025 ng/ml zehn Tage post operationem. Darüber hinaus wurde bei vier Hündinnen (Tab. 3: Nr. 13, 14, 16, 18) die AMH Konzentration auch an Tag 1, 2 und 3 nach Kastration bestimmt. Drei dieser Hündinnen (Tab. 3: Nr. 14, 16 und 18) zeigten bereits einen Tag nach der Kastration einen starken Abfall der AMH-Konzentration. Hündin Nr. 16 zeigte an Tag 2 einen erneuten Anstieg, was aber wahrscheinlich einen Messfehler darstellt. Bei Hündin Nr. 13 sank die AMH-Konzentration linearer ab. Im Mittel lag die AMH-Halbwertszeit im Serum der Hündinnen nach Kastration bei 2,0 +/- 0,5 Tagen (Abb. 16).



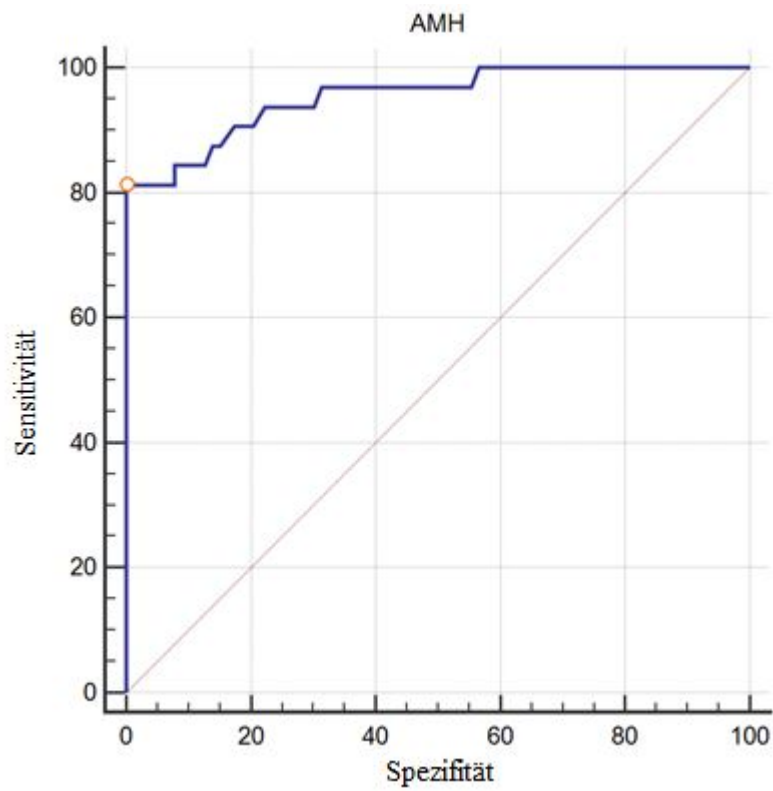
**Abb. 16:** AMH-Konzentrationsverlauf nach Kastration der 8 Hündinnen als Strichdiagramm. Messzeitpunkte an Tag 0, am Tag der Kastration und an Tag 10 post operationem und zusätzlich an den Tagen 1 bis 3 nach Kastration bei Hündin Nr. 13, 14, 16 und 18. Gestrichelte Linie: Mittlere Halbwertszeit.

**Tabelle 3:** AMH-Konzentrationen im Zeitverlauf von Tag 0 bis 10 nach erfolgter Kastration bei den Hündinnen Nr. 12 bis Nr. 19

Hündin (Nr.)	Tag	AMH (ng/ml)
<b>12</b>	Tag 0	0,22
	<b>Tag 10</b>	<b>0,06</b>
<b>13</b>	Tag 0	0,73
	Tag 1	0,62
	Tag 2	0,43
	Tag 3	0,32
	<b>Tag 10</b>	<b>0,03</b>
<b>14</b>	Tag 0	0,32
	Tag 1	0,07
	Tag 2	0,06
	Tag 3	0,04
	<b>Tag 10</b>	<b>0,02</b>
<b>15</b>	Tag 0	0,31
	<b>Tag 10</b>	<b>0,02</b>
<b>16</b>	Tag 0	0,71
	Tag 1	0,29
	Tag 2	0,36
	Tag 3	0,21
	<b>Tag 10</b>	<b>0,03</b>
<b>17</b>	Tag 0	0,28
	<b>Tag 10</b>	<b>0,01</b>
<b>18</b>	Tag 0	0,19
	Tag 1	0,06
	Tag 2	0,04
	Tag 3	0,02
	<b>Tag 10</b>	<b>0,01</b>
<b>19</b>	Tag 0	0,18
	<b>Tag 10</b>	<b>0,02</b>

### 3. Voruntersuchungen Teil 3: Bestimmung der AMH-Serumkonzentration bei Hündinnen in Abhängigkeit vom Kastrationszeitpunkt

Nach ROC-Kurvenanalyse (Abb. 17) aller kastrierten Hündinnen aus Teil 1 und 2 der Voruntersuchungen ( $n = 27$ ) ist bei einem AMH-Wert unter 0,07 ng/ml mit der geringstmöglichen Fehlerwahrscheinlichkeit (falsch positiv, falsch negativ) davon auszugehen, dass die Hündin kastriert ist, wenn mindestens 10 Tage nach der Kastration vergangen sind.



**Abb. 17:** ROC-Kurvenanalyse. Der rote Kreis markiert den Punkt im Kurvenverlauf, bei dem bei einem AMH < 0,07 ng/ml die Spezifität bei 100% und die Sensitivität bei 81,25% liegt.



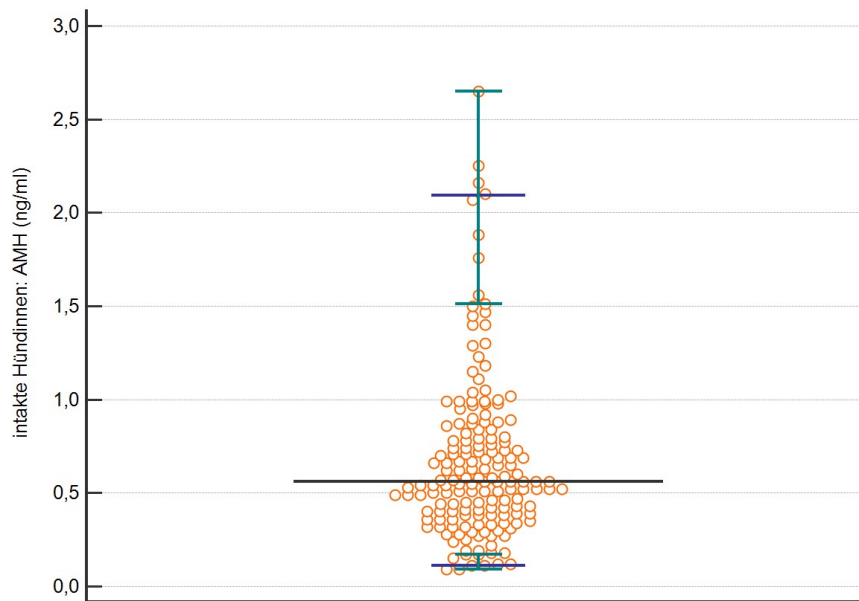
#### 4. Ergebnisse der Hauptstudie: Konzentrationsverlauf des AMHs über den Reproduktionszyklus

Insgesamt wurde bei den 19 intakten Hündinnen 141-mal in den Zyklusphasen später Anöstrus, Proöstrus, Östrus, Metöstrus und im mittleren Anöstrus die AMH-Konzentration im Rahmen der Untersuchungen des Hauptversuches bestimmt (Tab. 4). Im Anhang sind die AMH-Einzelwerte jeder Hündin in den Tabellen 1 bis 19, sowie die AMH-Verläufe über den Zyklus in Strichdiagrammen in den Abbildungen 1 bis 19 aufgeführt.

**Tabelle 4:** Anzahl der Blutproben (n), Median-, Minimal- und Maximalwerte der AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml in den einzelnen Zyklusphasen

Zyklusstadium	n	median ng/ml	min ng/ml	max ng/ml
Später Anöstrus	18	0,86	0,17	1,56
Proöstrus	41	0,93	0,09	2,65
Östrus	44	0,60	0,09	1,88
Metöstrus	19	0,42	0,11	2,1
Mittlerer Anöstrus	19	0,51	0,12	0,97

Die AMH-Konzentrationen lagen zwischen 0,09 und 2,65 ng/ml (Abb.18, Tab. 4). Der Medianwert betrug 0,58 ng/ml. Die untere Referenzgrenze (Abb. 18, untere blaue Linie) lag bei 0,11 ng/ml (90 % Konfidenzintervall: 0,09 - 0,17 ng/ml). Die obere Referenzgrenze (Abb. 18, obere blaue Linie) bei 2,09 ng/ml (90 % Konfidenzintervall: 1,51 - 2,65 ng/ml).



**Abb.18:** Dotplots aller gemessenen AMH-Serumkonzentrationen ( $n=141$ ) der intakten Hündinnen über den gesamten Zyklus. Blau: Referenzgrenzen; Grün: 90% Konfidenzintervalle; schwarz: Medianwert. Y-Achse: AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml.

Es konnte festgestellt werden, dass die verschiedenen Zyklusphasen einen großen Einfluss auf die AMH-Konzentration haben (Abb. 19). Auch die Rasse, respektive die Körpergröße der Hunde bedingte einen deutlichen Unterschied: Die Gruppe der Beagle zeigte überwiegend höhere mittlere AMH-Konzentrationen als die der FBIs (Abb. 20). Der Konzentrationsverlauf unterlag insgesamt hohen interindividuellen Schwankungen. Auch innerhalb des Zyklus einer Hündin fanden sich teilweise stark unterschiedliche Konzentrationen (Anhang Abb. 1 bis 19 und Anhang Tab. 1 bis 19). Bei den beiden Hündinnen „Amidala“ (Anhang Abb. 5, Tab. 5) und „Hermine“ (Anhang Abb. 18, Tab. 18), welche durchweg höhere AMH-Serumkonzentrationen als alle anderen Hündinnen zeigten, wurde nach Abschluss der Untersuchungen und Bestimmung der AMH-Konzentrationen eine abdominale Ultraschalluntersuchung zum Ausschluss von strukturell veränderten Ovarien von einem Fachtierarzt für Radiologie durchgeführt. Die Ovarien von beiden Hündinnen stellten sich in der sonografischen Untersuchung unauffällig dar.

Die Darstellung der Konzentrationsverläufe aller Hündinnen erfolgte nach den erhaltenen Konzentrationsgradienten und ist in Abbildung 19 dargestellt. Der Sexualzyklus wurde insgesamt in zehn Abschnitte unterteilt: dem mittleren Anöstrus (4 bis 5 Monate post ovulationem),

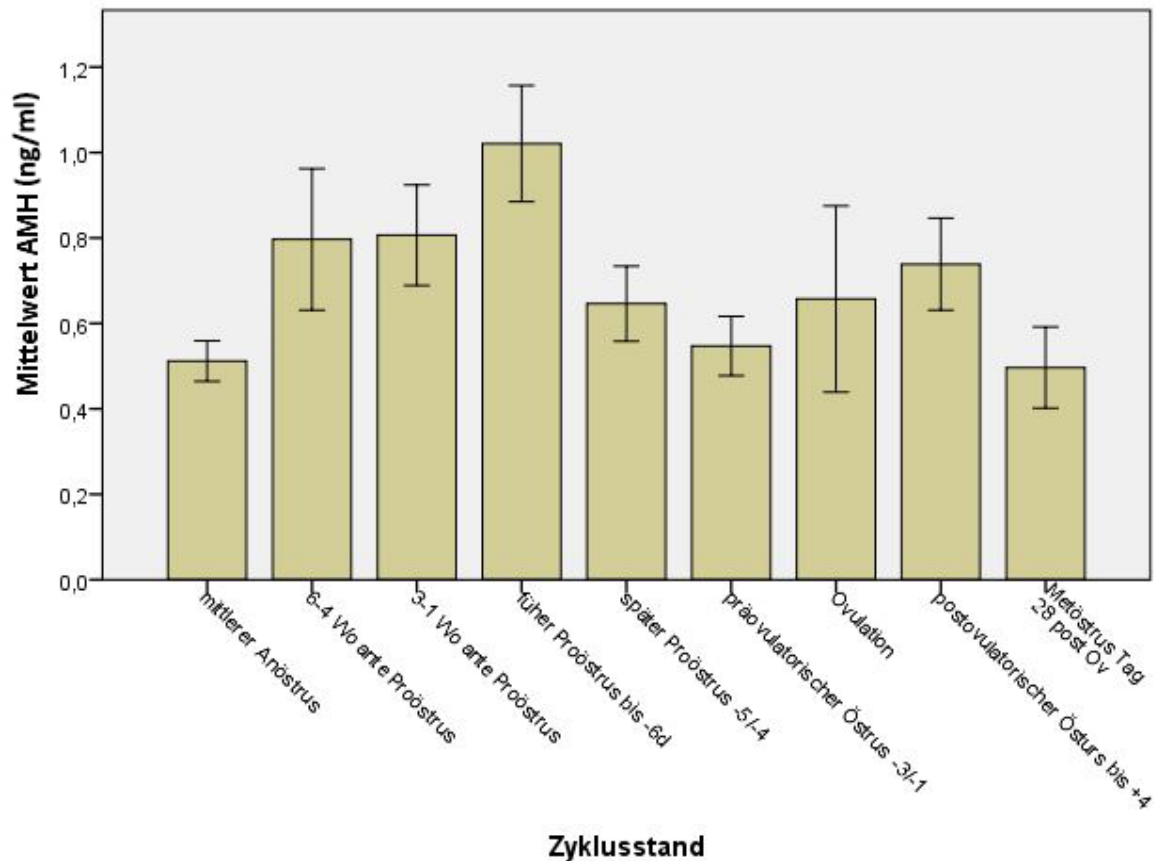
dem Zeitraum von sechs bis vier Wochen vor dem Proöstrus, dem Zeitraum von drei bis eine Woche vor Beginn des Proöstrus, dem frühen Proöstrus (bis sechs Tage vor der Ovulation), dem späten Proöstrus (fünf bis vier Tage vor der Ovulation), dem präovulatorischen Östrus (drei bis einen Tag vor der Ovulation), der Ovulation, dem postovulatorischen Östrus (bis vier Tage nach der Ovulation) und dem Metöstrus, der die Messung an Tag 28 nach der Ovulation umfasst. Die AMH-Konzentrationsverläufe aller Hündinnen folgten dabei einem ähnlichen Muster.

Die Untersuchungen ergaben folgenden AMH-Konzentrationsverlauf über den Zyklus:

Ausgehend von Basalniveaus im mittleren Anöstrus wurde ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,001$ ) der AMH-Konzentrationen bis zu sechs Tage vor der Ovulation festgestellt (Abb. 19, mittlerer Anöstrus bis früher Proöstrus). Danach fiel die mittlere AMH-Konzentration signifikant innerhalb von zwei Tagen vom frühen zum späten Proöstrus ab ( $p = 0,001$ ) (Abb. 19, früher Proöstrus bis später Proöstrus). Es konnte weiterhin ein Konzentrationsanstieg vom präovulatorischen Östrus zum postovulatorischen Östrus (Abb. 19) gemessen werden, welcher aber nicht signifikant war ( $p = 0,088$ ). Während der Ovulation gab es große Unterschiede in der AMH-Konzentration (Abb. 19, Ovulation). Die AMH-Konzentration fiel vom postovulatorischen Östrus zum Metöstrus (Abb. 19) signifikant ab ( $p = 0,013$ ).

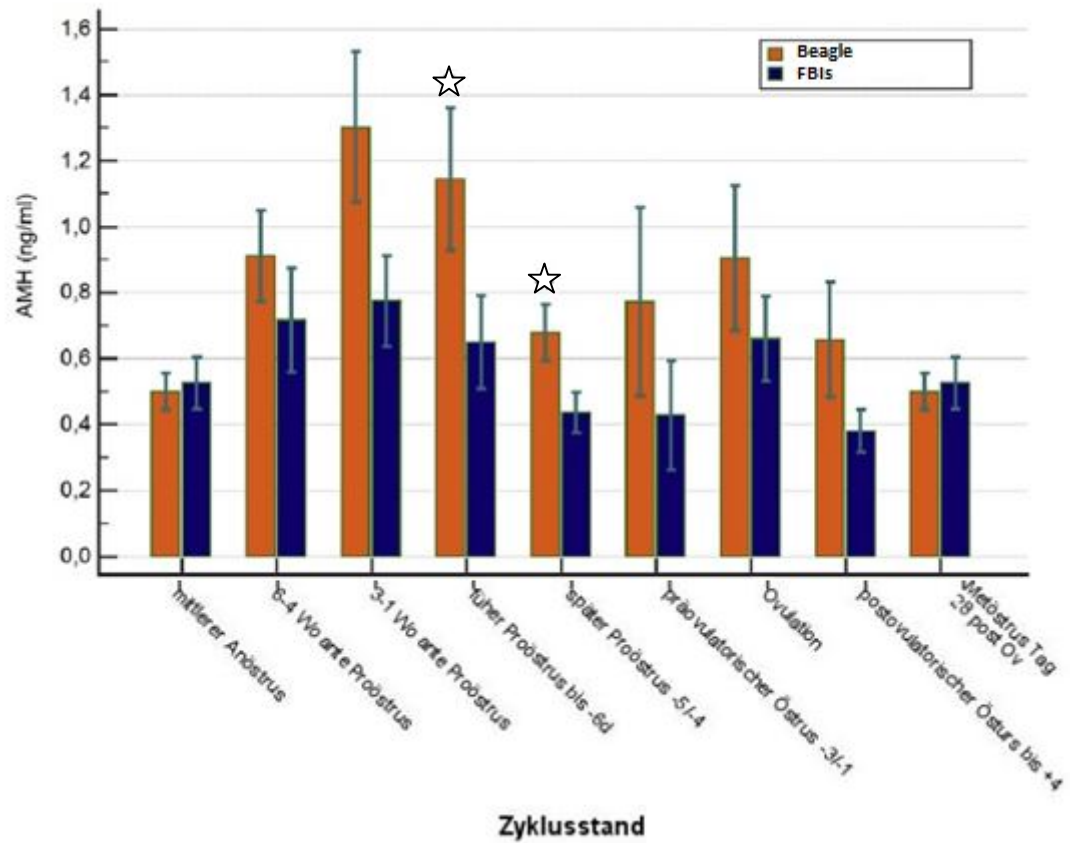
Im Zeitraum von drei Wochen vor Beginn der Läufigkeit bis sechs Tage vor der Ovulation (Abb. 19, früher Proöstrus) wurden die höchsten AMH-Konzentrationen erreicht. Bei vier Hündinnen, von denen jeweils Hündinnen der Rassen Beagle und FBIs vertreten waren, (Anhang Abb. 10, 13, 14, 19) unterschied sich die AMH-Konzentration nicht nennenswert zwischen der präovulatorischen Messung und dem Metöstrus. Bei fünf Hündinnen ebenfalls beider Rassen (Anhang Abb. 4, 7, 8, 14, 16) nicht zwischen Metöstrus und mittlerem Anöstrus. Bei den verbleibenden zehn Hündinnen konnten dagegen große Konzentrationsunterschiede festgestellt werden.

Insgesamt unterlag der Konzentrationsverlauf hohen interindividuellen und intraindividuellen Schwankungen. Der interindividuelle Konzentrationsunterschied während des Zyklusverlaufs war im späten Anöstrus (Abb. 19, 6 bis 4 Wochen ante Proöstrus) und zum Zeitpunkt der Ovulation (Abb. 19, Ovulation) am ausgeprägtesten. Der interindividuelle Variationskoeffizient betrug über den gesamten Zyklus 65,8 %.



**Abb. 19:** Säulendiagramm des mittleren AMH-Konzentrationsverlaufes aller Hündinnen über den gesamten Reproduktionszyklus. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SE), (+/-1) dar.

Bei getrennter Betrachtung der Versuchsgruppe 1 und 2, wiesen die kleineren Beagle ( $n = 10$ ) in allen Zyklusphasen außer im mittleren Anöstrus eine höhere durchschnittliche Serumkonzentration des AMHs auf als die FBIs ( $n = 9$ ) und waren dabei signifikant höher im späten Proöstrus ( $p = 0,040$ ) und im präovulatorischen Östrus ( $p = 0,014$ ) (Abb. 20).



**Abb. 20:** Säulendiagramm der mittleren AMH-Konzentrationen über den Zyklus im Vergleich Beagle mit FBIs. Der ☆ markiert die Zyklusphasen mit signifikanten Konzentrationsunterschieden (aus Walter et al. 2019)

## V Diskussion

Über den physiologischen Konzentrationsverlauf des AMHs während des Sexualzyklus der gesunden Hündin ist noch wenig bekannt. Bisher wurde nur in einer Studie von Nagashima et al. (2016) ein Anstieg der AMH-Konzentration im Übergang vom Anöstrus zum Proöstrus beschrieben. Um die AMH-Serumkonzentrationen von Hündinnen zu unterschiedlichen klinischen Fragestellungen richtig interpretieren zu können, ist die Kenntnis von physiologischen Referenzbereichen nötig. Weitere mögliche klinische Anwendungsbereiche des AMH, wie der Zusammenhang zwischen dem Reproduktionspotenzial einer Hündin und ihrer Serum-AMH-Konzentration wurden erst jüngst erkannt (Hollinshead et al. 2017) und lassen sich ohne das Wissen von physiologischen Konzentrationsbereichen nur schwer interpretieren. In dieser Arbeit wurden die AMH-Serumkonzentrationen von 19 Hündinnen über einen vollständigen Reproduktionszyklus gemessen. In drei Vorversuchen wurde mit Hilfe von AMH der Kastrationsstatus von Hündinnen, sowie die Halbwertszeit von AMH im Blutserum nach erfolgter Kastration bestimmt.

### 1. Bestimmung des Kastrationsstatus

Mit dem in dieser Studie verwendeten ECLIA konnte im Teil 1 der Voruntersuchungen der AMH-Cut-Off-Wert von 0,02 ng/ml für die Diagnose „kastriert“ bestimmt werden. Alle getesteten Hündinnen der Voruntersuchung konnten unabhängig von Alter, Größe und Zeitpunkt der Kastration als kastriert oder intakt identifiziert werden. Alm und Holst (2018) konnten kürzlich per ELISA insgesamt 51 von 52 (98%) der kastrierten Hündinnen als solche erkennen, wohingegen nur 64 von 73 (88%) der intakten Hündinnen als richtig positiv gemessen wurden. Place et al. (2011) definierten mit 0,09 ng/ml einen höheren Grenzwert für kastrierte Tiere. Wurden hundespezifische Testkits angewandt, wurden höhere AMH-Konzentrationen bei kastrierten Hündinnen gemessen. So beschrieben Turna Yilmaz et al. (2015) eine mittlere AMH-Konzentration von  $0,28 \pm 0,09$  ng/ml für die kastrierten Hündinnen, während bei Themmen et al. (2016) die AMH-Konzentration aller 48 kastrierten Hündinnen unter 1,1 ng/ml lagen. Im Gegensatz zu Alm und Holst (2018) fanden sich in der vorliegenden Studie keine falsch positiven oder falsch negativen Messungen. Das in der eigenen Studie verwendete ECLIA-Testsystem scheint damit sehr gut geeignet zu sein, was die Bestimmung eines Cut-Off-Wertes und damit eine einfache Interpretation der Ergebnisse und Unterschei-

dung zwischen kastrierten und intakten Tieren betrifft. Ein möglicher Einflussfaktor auf dieses positive Ergebnis könnte in dieser Arbeit allerdings die im Vergleich zu anderen Studien geringere Anzahl an Hündinnen sein.

Die Ergebnisse vieler tiermedizinischer Studien zeigen den diagnostischen Nutzen von AMH als Indikator für das Vorhandensein von Ovargewebe bei der Hündin, der Stute und der Katze (Ball et al. 2008; Ball et al. 2010; Günzel-Apel et al. 2012; Axnér und Ström Holst 2015a; Holst 2017; Nagashima et al. 2016; Pir Yagci et al. 2016; Themmen et al. 2016; Turna Yilmaz et al. 2015). Auch wenn einzelne Studien falsch positive Ergebnisse bei Hündinnen und Rüden lieferten (Alm und Holst 2018; Themmen et al. 2016), so scheint die AMH-Bestimmung anderen Untersuchungsmethoden aus praktischer Sicht häufig überlegen zu sein. Die Vaginalzytologie liefert nur dann ein eindeutiges Ergebnis, wenn sie zum Zeitpunkt des Proöstrus oder Östrus durchgeführt wird. Zusätzlich zum zytologischen Bild müssen eventuell noch andere diagnostische Maßnahmen, wie eine Progesteronmessung erfolgen (Feldman und Nelson 2001). Eindeutige Tests, wie ein GnRH-Stimulationstest sind mit mehrfachen Untersuchungen beziehungsweise Blutentnahmen verbunden (Buijtelts et al. 2006). Eine sonografische Untersuchung kann für den Nachweis von Ovarien hilfreich sein, ist aber nur durch einen erfahrenen Untersucher sinnvoll umzusetzen (Ball et al. 2010). Nach der Kastration der Hündin entfällt der negative Feedback-Mechanismus des Östradiols auf die LH-Sekretion und LH steigt messbar an (Olson et al. 1984). Da LH bei der intakten Hündin zwar während der meisten Zeit des Zyklus auf Basalniveau bleibt, aber alle 1 bis 8 Stunden für durchschnittlich 72 Minuten pulsatil in die Höhe schießt (Padmanabhan and McNeilly 2001), sowie während des LH-Peaks erhöht ist (Kooistra et al. 1999), birgt die Messung dieses Hormones die Gefahr, intakte Hündinnen während eines solchen Peaks zu messen und fälschlicherweise als kastriert zu diagnostizieren (Lofstedt und Vanleeuwen 2002). AMH-Konzentrationen oberhalb des Cut-Off-Wertes kamen bei kastrierten Hündinnen in der vorliegenden Studie nicht vor, wurden aber bereits bei Place et al. (2011) beschrieben. Es wurde von den Autoren kein Grund für diese Erhöhungen der Serumkonzentration gefunden, vermutlich handelte es sich um Messartefakte. In der vorliegenden Studie gelang es, den Kastrationsstatus aller Hündinnen unabhängig vom Zyklusstadium festzustellen, wie es auch bereits bei Turna Yilmaz et al. (2015) und Themmen et al. (2016) beschrieben wurde. Die AMH-Konzentrationsbereiche der intakten Hündinnen des ersten Vorversuches dieser Studie sind mit 0,19 ng/ml bis 1,45 ng/ml und einer mittleren Konzentration von 0,64 ng/ml vergleichbar mit den Ergebnissen von Nagashima et al. (2016) (0,2 ng/ml bis 0,99 ng/ml) und Place et al. (2011) (0,1 ng/ml bis 0,78 ng/ml), aber

niedriger als die von Turna Yilmaz et al. (2015) und Hollinshead et al. (2017), die mit caninen ELISA-Kits AMH-Konzentrationen von  $4,26 \pm 0,82$  ng/ml bzw. 2,9 ng/ml bis 21.1 ng/ml erhielten. Die AMH-Konzentrationsbereiche der humanen ELISA-Kits liegen in allen genannten Studien unter denen der caninen Kits. Auch mit der in der vorliegenden Studie verwendeten ECLIA-Methode wurden Konzentrationsbereiche unterhalb der caninen ELISA-Kits gemessen. Aber nicht alle in den genannten Studien erprobten caninen Testkits erbringen die gewünschte Sensitivität. Es wird teilweise die fehlende Ausreifung der caninen Kits und fehlende Standardisierung der Referenzwerte derselben bemängelt (Pir Yagci et al. 2016). Ob letztendlich eines humanes oder canines, im Handel erhältliches, und damit in der täglichen Praxis einsetzbares ELISA-Testsystems eine höhere Sensitivität und Spezifität aufzeigt, ist noch nicht abschließend geklärt. Momentan scheinen die humanen ELISA-Kits den caninen Kits noch überlegen.

## 2. Bestimmung der Halbwertszeit des AMH im Serum nach Kastration

Bei den in dieser Studie untersuchten AMH-Halbwertszeiten mit Verlaufspunkten innerhalb von 10 Tagen nach der Kastration konnte ein deutlicher Abfall der AMH-Serumkonzentration bei allen acht Hündinnen gemessen werden.

Die Serum-Konzentration lag nach zehn Tagen bei allen Hündinnen bei  $\leq 0,06$  ng/ml. Pir Yagci et al. (2016) maßen bei Hündinnen sogar einen noch stärkeren Abfall mit durchschnittlich 0,006 ng/ml zehn Tage post castrationem. Im Mittel lag die Halbwertszeit der AMH-Konzentration in dieser Studie bei  $2,0 \pm 0,5$  Tagen. Dieses Ergebnis muss jedoch mit Rücksicht auf die geringe Anzahl an Versuchstieren interpretiert werden. Ob AMH nach Entfernung der Keimdrüsen bei Tieren generell langsamer als beim Menschen abgebaut wird, ist anhand der zu geringen Studienanzahl nicht ausreichend zu beurteilen. Der erneute Anstieg der Konzentration von Hündin Nr. 16 an Tag 2 stellt vermutlich einen Messfehler dar. Vigier et al. (1983) maßen im Serum von Bullenkälbern, welche im Alter von einem Monat kastriert wurden, bereits eine Halbwertszeit von zwei Tagen. Eine Halbwertszeit im Serum von 1,9 Tagen wurde bei ovariectomierten Stuten nachgewiesen (Almeida et al. 2011). Eine Studie aus der Humanmedizin stellte bei Frauen hingegen eine etwas kürzere AMH-Halbwertszeit von durchschnittlich 27,6 Stunden fest (Griesinger et al. 2012).



### 3. Bestimmung der AMH-Serumkonzentration in Abhängigkeit vom Kastrationszeitpunkt

Nach der vorliegenden Studie können Hündinnen als kastriert angesprochen werden, wenn sie zehn Tage nach der Kastration einen AMH-Wert von unter 0,07 ng/ml aufweisen. Aufgrund der geringen Anzahl an Versuchshündinnen liefert dieses Ergebnis jedoch nur einen ungefähren Anhaltspunkt der AMH-Konzentration, die zehn Tage nach Kastration mit dem angewandten Testsystem zu erwarten ist. Pir Yagci et al. (2016) fanden mit einem humanen ELISA-Kit annähernd ähnliche AMH-Werte von  $0,006 \pm 0,22$  ng/ml zehn Tage nach Kastration. Der gemessene Abfall der AMH-Konzentrationen bei Pir Yagci et al. (2016) mit dem caninen ELISA-Kit zwischen  $12,08 \pm 22,81$  ng/ml prä und  $9,55 \pm 15,42$  ng/ml post castrationem war dagegen statistisch nicht signifikant.

### 4. Konzentrationsverlauf des AMH über den Reproduktionszyklus

#### 4.1 Absolute Werte, Maximal- und Minimalwerte

Die AMH-Konzentrationen der untersuchten Hündinnen lagen zwischen 0,09 ng/ml im Proöstrus und Östrus und 2,65 ng/ml im Proöstrus. Damit stellte der Proöstrus den Zyklusabschnitt mit den niedrigsten und gleichzeitig den höchsten Konzentrationen dar. Die geringsten Konzentrationsunterschiede zwischen den Hündinnen fanden sich im mittleren Anöstrus. Dies war zu erwarten, da das Ovar im mittleren Anöstrus nicht endokrin aktiv ist. Der Medianwert über den Zyklus betrug 0,58 ng/ml. Damit liegt dieser höher als in der Studie von Nagashima et al. (2016), die  $0,3 \pm 0,01$  ng/ml als Medianwert gemessen haben. Sie untersuchten allerdings nur die Zyklusabschnitte vom späten Anöstrus bis zum Östrus.

Bei Stuten fanden Almeida et al. (2011) mittlere Serumkonzentrationen von  $0,96 \pm 0,08$  ng/ml über den Zyklus, mit Konzentrationen von 0,22 ng/ml bis 2,94 ng/ml. El-Seikh Ali et al. (2013) kamen bei Rindern zu einem Medianwert von nur  $0,09 \pm 0,003$  ng/ml mit Konzentrationen von 0,05 ng/ml bis 0,21 ng/ml.

#### 4.2 Maximalwerte als Indikator für GCT

Diagnostisch wertvoll ist AMH nicht nur in der Frage, ob ein Hund noch aktives Gonadengewebe besitzt, sondern auch als Biomarker für Granulosazelltumoren. Walter et al. (2018) bewiesen dies jüngst, indem sie die AMH-Serumkonzentrationen von Hündinnen mit Granulosazelltumor mit denen von gesunden Hündinnen, von Hündinnen mit zystisch veränderten Ovarien und mit Ovarialtumoren anderer Genese verglichen. Die Autoren kamen mit demselben ECLIA-Testverfahren, wie es in dieser Studie benutzt wurde, zu einem Cut-Off-Wert von 2,09 ng/ml für die Diagnose von Granulosazelltumoren. In der vorliegenden Arbeit wiesen zwei Hündinnen jedoch höhere AMH-Konzentrationen als 2,09 ng/ml während des Übergangs von spätem Anöstrus zu Proöstrus und eine von ihnen sogar im Metöstrus auf. Wie alle in dieser Studie teilgenommenen Hündinnen zeigten diese beiden Tiere physiologische Zyklen. Die Ovarien dieser Hündinnen wurden zusätzlich sonografisch untersucht und zeigten keine Hinweise auf ein pathologisches Geschehen. Diese beiden Fälle könnten hinweisend sein, dass AMH-Konzentrationen oberhalb dem von Walter et al (2018) festgelegten Grenzwert von 2,09 ng/ml durchaus bei gesunden Hündinnen vorkommen können. Es erscheint daher sinnvoll, Blutproben zur Tumordiagnostik nicht im späten Anöstrus oder frühen Proöstrus zu nehmen. Da jedoch bei einer der beiden Hündinnen ebenso im Metöstrus eine Konzentration von über 2,09 ng/ml gemessen wurde, sollte die Diagnose eines Granulosazelltumors besser nur bei Konzentrationen gestellt werden, die deutlich über diesem Cut-Off-Wert liegen. Um Fehlinterpretationen vorzubeugen, könnte außerdem bei Hündinnen, welche sich zum Zeitpunkt der AMH-Messung im Proöstrus befinden und sonografisch keine Ovarpathologien feststellbar sind, wenige Tage später eine zweite AMH-Messung durchgeführt werden, da AMH im Laufe des präovulatorischen Östrus wieder sinkt.

#### 4.3 Einfluss der Zyklusstadien und gesamter Verlauf im Zyklus

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass der AMH-Konzentrationsverlauf bei allen Hündinnen während des Zyklus zwar erheblichen, doch gleichartigen Schwankungen unterlag und dabei starke interindividuelle Konzentrationsunterschiede aufwies. Vor allem im späten Anöstrus und zum Zeitpunkt der Ovulation waren die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Hündinnen am ausgeprägtesten.

Bei Stuten war der Verlauf der AMH-Konzentration über den Reproduktionszyklus relativ konstant und weder von Trächtigkeiten noch den Zyklusstadien an sich beeinflusst (Almeida et al. 2011). Bei Kühen zeigten zwei Studien keine signifikanten Konzentrationsschwankungen während des Zyklus und der Trächtigkeit (El-Sheikh Ali et al. 2013; Nabenishi et al. 2017). In einer anderen Arbeit wurde bei Kühen ein AMH-Peak am ersten Tag des Zyklus beschrieben (Rico et al. 2011).

Der signifikante Anstieg der AMH-Konzentration aller Hündinnen am Übergang vom späten Anöstrus zum Proöstrus, gefolgt von einem signifikanten Abfall der AMH-Konzentration in den letzten sechs Tagen vor der Ovulation, wie er in dieser Arbeit festgestellt wurde, entspricht den Untersuchungsergebnissen von Nagashima et al. (2016). Der hier festgestellte Konzentrationsanstieg zwischen spätem Anöstrus und frühem Proöstrus konnte im Zeitraum von 30 bis vier Tagen vor dem LH-Peak ebenso von Nagashima (2016) konstatiert werden.

Auch bei der Frau (Gnoth et al. 2015) und der Kuh (Rico et al. 2011) sind AMH-Konzentrationsanstieg während der präovulatorischen Follikelphase beschrieben.

AMH wurde in einer Studie immunhistochemisch am stärksten in den Granulosazellen der Präantral- und kleinen Antralfollikel nachgewiesen (Nagashima et al. 2016). Diese Follikelstadien werden bei der Hündin im Proöstrus verstärkt gebildet (England et al. 2009). Der Anstieg von AMH zwischen Anöstrus und Östrus könnte bei der Hündin, wie auch bei anderen Spezies, durch die vermehrte Bildung der Präantral- und kleinen Antralfollikel in diesem Zeitraum erklärt werden (England et al. 2009). Diese Ergebnisse könnten den starken AMH-Anstieg im Serum am Übergang vom Anöstrus zum frühen Proöstrus erklären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass die AMH-Konzentration nach dem präovulatorischen Abfall nicht auf diesem niedrigen Niveau bleibt. Es kam bei einigen Hündinnen zu Schwankungen während der Ovulation und bei allen Hündinnen zu einem signifikanten Abfall vom postovulatorischen Östrus zum Metöstrus. Eine mögliche Erklärung für diese weiteren Fluktuationen könnte der Einfluss von in allen Zyklusphasen vorkommenden, kleinen Antralfollikeln mit einem Durchmesser von unter 2 mm und mittleren Antralfollikeln zwischen 2 und 3 mm sein (Groppetti et al. 2015). Letztere sind bei Hündinnen bis in den späten Metöstrus nachzuweisen (Groppetti et al. 2015). Dies wurde jedoch in der vorliegenden Studie nicht untersucht.

Der in dieser Arbeit gemessene Abfall der AMH-Konzentration ab sechs Tage vor der Ovulation konnte bei Nagashima et al. (2016) ab Tag vier vor dem LH-Peak festgestellt werden. Die Vorhersage der baldigen Ovulation und damit die Bestimmung des Decktermins ist eine denkbare klinische Anwendung von AMH, die vor allem für die Hundezucht von Bedeutung wäre. Eine bevorstehende Läufigkeit könnte bereits etliche Tage vor ihrem Eintritt durch die steigenden AMH-Konzentration erkannt werden. Damit wäre der AMH-Wert ein denkbare Diagnostikum, welches zeitlich bereits vor dem Progesteron-Test zum Einsatz kommen könnte. Eine Schwierigkeit könnte hierbei jedoch das individuell sehr unterschiedliche AMH-Basalniveau von Hündinnen darstellen, welches einen bestimmten Konzentrationswert zur Vorhersage einer Läufigkeit schwierig definieren lässt. Auch Nagashima et al. (2016) fanden erhebliche interindividuelle Unterschiede des Basalniveaus. Die niedrigsten Konzentrationen wurden in der vorliegenden Studie teilweise im präovulatorischen Östrus, teilweise im Metöstrus oder mittleren Anöstrus erreicht. Außerdem stieg die Konzentration bei acht Hündinnen zwischen Metöstrus und mittlerem Anöstrus bereits um das 1,5-fache bis 2-fache und stieg bei vier dieser Hündinnen im späten Anöstrus nicht mehr weiter an. Nur eine Hündin erreichte ihre Maximalkonzentration während des Metöstrus. Es erscheint daher sinnvoll, den Metöstrus als Zyklusphase für eine AMH-Basalwert-Bestimmung zu definieren, jedoch wird dafür eine weitere Studie mit einer größeren Anzahl von Hündinnen nötig sein. Die vorliegende Arbeit beschränkte sich mit der Untersuchung des AMH-Konzentrationsverlaufes auf einen Reproduktionszyklus, somit bleibt es weiteren Untersuchungen vorbehalten, ob intraindividuelle Verlaufsschwankungen über mehrere Zyklen existieren.

Die hohen Konzentrationsschwankungen innerhalb des Zyklus der einzelnen Hündinnen in dieser Studie stehen im Kontrast zu den minimalen Schwankungen bei Rindern (Rico et al. 2011) und Frauen (Gnoth et al. 2015). In dieser Arbeit stieg die AMH-Konzentration mindestens um das Eineinhalbfache über das Basalniveau an und der maximale Anstieg betrug das Vierfache. Damit sind die individuellen Konzentrationsanstiege höher als bei Nagashima et al (2016). Ein Grund dafür könnte in dieser Arbeit der stärkere Abfall der AMH-Konzentration nach dem postovulatorischem Östrus und die größere Anzahl an Versuchshündinnen sein.

## 5. Höhere AMH-Maximalkonzentrationen der Beaglehündinnen

Es konnte in der vorliegenden Studie kein Unterschied zwischen den Verlaufsmustern der AMH-Konzentrationen zwischen der Gruppe der kleinen Hündinnen (Beagle) und der Gruppe der großen Hündinnen (FBIs) festgestellt werden. Jedoch zeigte sich ein Zusammenhang zwischen den mittleren AMH-Serumkonzentrationen und der Körpergröße der Hündinnen, da die kleineren Hündinnen höhere durchschnittliche AMH-Serumkonzentrationen als die größeren aufwiesen. Ein Zusammenhang zwischen Körpergröße und AMH-Maximalkonzentration konnte bereits bei Hollinshead et al. (2017) festgestellt werden. Welche Ursache diese Korrelation zwischen Körpergröße und AMH-Konzentration hat ist zum aktuellen Zeitpunkt noch unklar.

## 6. Ausblick

Wie bei der Frau bereits praktiziert, könnte der Serum-AMH-Wert auch bei Hündinnen Rückschlüsse über das individuelle Reproduktionspotenzial zulassen. Mit steigender Lebenserwartung geht der aktuelle Trend bei Frauen zu Geburten in immer höherem Lebensalter (Broer et al. 2011). Hollinshead et al (2017) fanden bereits eine positive Korrelation zwischen hoher AMH-Konzentration und Wurfgröße bei Hündinnen. In der vorliegenden Studie nahmen keine trächtigen Hündinnen teil. Es wurde aber eine negative Korrelation zwischen Körpergröße, Gewicht und maximaler AMH-Konzentration gefunden. Eine Vorhersage der Wurfgröße anhand der maximalen AMH-Konzentration einer Hündin könnte in Zukunft die Zuchtauswahl von Hündinnen beeinflussen. Subfertile Hündinnen könnten erkannt und vom Zuchtprogramm ausgeschlossen werden. Damit könnten Zuchtprogramme einzelner Hunderassen effizienter gestaltet werden. Auch bei der Hündin sinkt wie bei der Frau mit steigendem Lebensalter die AMH-Konzentration (Hollinshead et al. 2017). Hündinnen im Alter von über vier Jahren zeigten geringere Wurfraten als Hündinnen unter vier Jahren (Hollinshead et al. 2017). Es scheint somit eine Analogie zu einigen Studien aus der Humanmedizin zu bestehen, in denen das fortschreitende Alter als Hauptursache für ausbleibende Schwangerschaften konstatiert wird (Smeenk et al. 2007; Lin et al. 2013; Zarek et al. 2015). Bisher unerforscht ist auch die Frage, ob das individuell höchste oder niedrigste AMH-Basalniveau oder der individuelle AMH-Anstieg für die Fertilität einer Hündin aussagekräftig sind. Weitere, potenziell mit AMH in Verbindung stehende Parameter, wie Gewicht der Welpen oder Abortrate sind denkbar. Um diese Fragestellungen beantworten zu können sind weitere Untersuchungen nötig.

## VI Zusammenfassung

Das Anti-Müller-Hormon (AMH) oder Muellerian-Inhibiting Substance (MIS) wird beim Menschen wie beim Säugetier, ausschließlich in den Granulosazellen der Ovarien und den Sertolizellen der Hoden sezerniert. Infolge einer Kastration sinkt die AMH-Konzentration im Blutserum ab, weshalb die Messung dieses Hormons dazu herangezogen werden kann, zwischen kastrierten und intakten Tieren beziehungsweise Hündinnen oder Katzen mit Ovarrestsyndrom zu differenzieren. Außerdem sind deutlich erhöhte AMH-Konzentrationen beim Vorliegen eines Granulosazelltumors (GCT) oder Sertolizelltumors (SCT) beschrieben. Darüber hinaus dient AMH bei Frauen zur Bestimmung der ovariellen Reserve. Auch bei Rindern kann AMH als Fertilitätsmarker genutzt werden. Eine aktuelle Studie bei Hündinnen beschreibt eine positive Korrelation zwischen der AMH-Konzentration und der Wurfgröße. Um den Einsatz von AMH als Fertilitätsmarker bei der Hündin prüfen zu können, müssen physiologische Konzentrationsbereiche des AMHs, sowie zyklusbedingte Konzentrationsschwankungen bekannt sein, die bisher jedoch kaum untersucht wurden. Ziel dieser Studie war es den Konzentrationsverlauf von AMH über den Reproduktionszyklus der Hündin zu untersuchen. Dafür wurde AMH bei 19 gesunden Hündinnen (zehn Beagle- und neun FBI-Hündinnen) über einen vollständigen Zyklus bestimmt. In Vorversuchen wurde mit dem verwendeten ECLIA-Testsystem AMH bei 19 kastrierten und 19 intakten Hündinnen sowie der Verlauf des AMHs nach Kastration zur Bestimmung der Halbwertszeit bei acht Hündinnen gemessen. Von den 19 vorberichtlich kastrierten Hündinnen wurden mit einem Cut-Off-Wert von 0,02 ng/ml alle richtig als solche erkannt. Die 19 intakten Hündinnen hatten AMH-Konzentrationen zwischen 0,19 und 1,45 ng/ml, mit einer mittleren Konzentration von 0,64 ng/ml. Bei den acht Hündinnen sank die AMH-Konzentration nach Kastration innerhalb von zehn Tagen auf Werte  $\leq 0,06$  ng/ml ab. Die mittlere Halbwertszeit betrug  $2,0 \pm 0,5$  Tage. Das Verlaufsmuster von AMH über den Zyklus war bei allen 19 Hündinnen vergleichbar. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg vom späten Anöstrus bis sechs Tage vor der Ovulation, ein signifikanter Abfall vom Proöstrus zum postovulatorischen Östrus und im weiteren Verlauf ein signifikanter Abfall vom postovulatorischen Östrus hin zum Metöstrus. Insgesamt lagen die AMH-Konzentrationen zwischen 0,09 und 2,65 ng/ml und wiesen starke inter- und intraindividuelle Schwankungen auf. Die niedrigsten Konzentrationen wurden zum Zeitpunkt der Ovulation, im Metöstrus oder im Anöstrus gemessen, die höchsten im späten Anöstrus und frühen Proöstrus. Die kleineren Beagle-Hündinnen wiesen dabei höhere mittlere AMH-Serumkonzentrationen auf als die FBI-Hündinnen. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass

die AMH-Messung mit dem verwendeten ECLIA-Testsystem dazu geeignet ist, die Existenz von Ovargewebe unabhängig vom Zyklusstadium zweifelsfrei zu diagnostizieren. Darüber hinaus wurden starke zyklusabhängige intra- und interindividuelle Konzentrationsvarianzen des Anti-Müller-Hormons festgestellt, was eine Herausforderung für die Interpretation einzelner AMH-Werte darstellt. Bei zwei der untersuchten Hündinnen überstiegen die AMH-Serumkonzentrationen im Zyklusverlauf den für GCT beschriebenen Cut-Off-Wert, was bei zukünftigen Diagnosestellungen berücksichtigt werden muss. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob sich die AMH-Konzentrationen einer Hündin auch von Zyklus zu Zyklus unterscheiden. Für den möglichen Einsatz von AMH als Fertilitätsmarker müsste darüber hinaus untersucht werden, ob die höchste oder die niedrigste AMH-Konzentration oder der individuelle Anstieg des AMHs am besten mit Fertilitätsparametern korreliert.

## VII Summary

In humans and mammals the anti-Müllerian hormone (AMH) or Müllerian inhibiting substance (MIS) is only produced in the granulosa cells of the ovaries and the Sertoli cells of the testes. The decrease of the AMH concentration after gonadectomy helps to determine the castration status and diagnose ovarian remnant syndrome. In contrast, granulosa cell tumours (GCT) and Sertoli cell tumours lead to extremely high AMH concentrations. In women AMH can be used to define the ovarian reserve and in cows AMH is described as a marker for fertility, too. A recent study in bitches described the positive correlation between the AMH concentration and litter size. However, for the use of AMH as a fertility marker in bitches the physiological range of AMH and changes in the concentration during the oestrous cycle has to be known and were the aim of this study. Therefore, AMH was measured in 19 healthy bitches over a whole reproductive cycle to analyze the physiological concentration course. In a preliminary study, the AMH concentrations of 19 spayed and 19 intact bitches and in eight bitches the decline in the AMH concentration after spaying have been measured. For AMH measurement an ECLIA test system has been used. All of the 19 spayed bitches have been detected correctly with a cut-off value of 0.02 ng/ml. The AMH values of the 19 intact bitches varied between 0.19 and 1.45 ng/ml with a median concentration of 0.64 ng/ml. Furthermore, the AMH concentrations decreased severely ( $\leq 0.06$  ng/ml) within ten days after spaying with a half-life of  $2.0 \pm 0.5$  days. The AMH concentrations over the oestrous cycle varied between 0.09 and 2.65 ng/ml with high inter-individual and intra-individual variations, but with a similar concentration course in all bitches. There was a significant increase of the AMH concentrations from late anoestrus up to six days before ovulation, a significant decrease from prooestrus to postovulatory oestrus and a further significant decrease from postovulatory oestrus to metoestrus. The highest AMH concentrations were reached from late anoestrus to early prooestrus and the lowest AMH concentrations were determined around ovulation, in metoestrus and dioestrus. The mean AMH-maximum values were higher in the Beagles than in the larger bitches. This study shows that AMH values can be used to determine the castration status independent of the oestrous cycle phase. Over the oestrous cycle high intra- and inter-individual variations of the AMH concentrations could be determined, what represent a challenge in interpreting single AMH values. In two of the examined bitches the AMH concentrations outreached the cut-off-level described for GCT, what should be considered in future diagnoses. Further studies are needed to examine,



if AMH also varies from oestrous cycle to oestrous cycle. Then, for the use of AMH as a fertility marker in female dogs further studies are necessary to examine if the highest AMH value, the lowest AMH value or the individual increase in the AMH concentration shows the best correlation to fertility parameters.

## VIII Literaturverzeichnis

- Alm, H., and B. S. Holst. 2018. 'Identifying ovarian tissue in the bitch using anti-Mullerian hormone (AMH) or luteinizing hormone (LH)', *Theriogenology*, 106: 15-20.
- Almeida, J., B. A. Ball, A. J. Conley, N. J. Place, I. K. M. Liu, E. L. Scholtz, L. Mathewson, S. D. Stanley, and B. C. Moeller. 2011. 'Biological and clinical significance of anti-Müllerian hormone determination in blood serum of the mare', *Theriogenology*, 76: 1393-403.
- Ano, H., Y. Hidaka, and H. Katamoto. 2014. 'Evaluation of anti-Mullerian hormone in a dog with a Sertoli cell tumour', *Vet Dermatol*, 25: 142-5, e41.
- Axnér, E., and B. Ström Holst. 2015. 'Concentrations of anti-Mullerian hormone in the domestic cat. Relation with spay or neuter status and serum estradiol', *Theriogenology*, 83: 817-21.
- Ball, B. A., A. J. Conley, S. A. Grundy, K. Sabeur, and I. K. Liu. 2008. 'Expression of anti-Mullerian hormone (AMH) in the equine testis', *Theriogenology*, 69: 624-31.
- Ball, R. L., S. J. Birchard, L. R. May, W. R. Threlfall, and G. S. Young. 2010. 'Ovarian remnant syndrome in dogs and cats: 21 cases (2000-2007)', *J Am Vet Med Assoc*, 236: 548-53.
- Banco, B., C. Giudice, M. C. Veronesi, E. Gerosa, and V. Grieco. 2010. 'An immunohistochemical study of normal and neoplastic canine sertoli cells', *J Comp Pathol*, 143: 239-47.
- Banco, B., M. C. Veronesi, C. Giudice, A. Rota, and V. Grieco. 2012. 'Immunohistochemical evaluation of the expression of anti-Mullerian hormone in mature, immature and neoplastic canine Sertoli cells', *J Comp Pathol*, 146: 18-23.
- Bell, E. T., J. B. Bailey, and D. W. Christie. 1973. 'Studies on vaginal cytology during the canine oestrous cycle', *Res Vet Sci*, 14: 173-9.
- Bergeron, L. H., S. G. Nykamp, B. A. Brisson, P. Madan, and C. J. Gartley. 2013. 'An evaluation of B-mode and color Doppler ultrasonography for detecting periovulatory events in the bitch', *Theriogenology*, 79: 274-83.
- Bostedt, H. 2016. 'Klinischer Untersuchungsgang und Untersuchungstechnik.' in A.-R. Günzel-Apel and H. Bostedt (eds.), *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze* (Schattauer: Stuttgart).
- Broer, S. L., M. Dolleman, B. C. Opmeer, B. C. Fauser, B. W. Mol, and F. J. Broekmans. 2011. 'AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis', *Hum Reprod Update*, 17: 46-54.
- Brugger, N., C. Otdorff, B. Walter, B. Hoffmann, and J. Braun. 2011. 'Quantitative determination of progesterone (P4) in canine blood serum using an enzyme-linked fluorescence assay', *Reprod Domest Anim*, 46: 870-3.
- Brunner, F. 1983. 'Praxisnahe Schnellfärbemethoden zur Vaginalzytologie bei der Hündin', *Tierarztl Prax*: 269-77.
- Buijtsels, J. J., N. J. Beijerink, H. S. Kooistra, S. J. Dieleman, and A. C. Okkens. 2006. 'Effects of gonadotrophin releasing hormone administration on the pituitary-ovarian axis in anoestrous vs ovariectomized bitches', *Reprod Domest Anim*, 41: 555-61.
- Bunck, C., and A.-R. Günzel-Apel. 2016. 'Zyklusdiagnostik.' in A.-R. Günzel-Apel and H. Bostedt (eds.), *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze* (Schattauer: Stuttgart), 35-48.
- Christie, D. W., J. B. Bailey, and E. T. Bell. 1972. 'Classification of Cell Types in Vaginal Smears During the Canine Oestrous Cycle', *British Veterinary Journal*, 128: 301-10.
- Christie, D. W., and E. T. Bell. 1972. 'Studies on canine reproductive behaviour during the normal oestrous cycle', *Animal Behaviour*, 20: 621-31.
- Claes, A., B. A. Ball, J. Almeida, C. J. Corbin, and A. J. Conley. 2013. 'Serum anti-Mullerian hormone concentrations in stallions: developmental changes, seasonal variation, and differences between intact stallions, cryptorchid stallions, and geldings', *Theriogenology*, 79: 1229-35.
- Concannon, P. W. 2011. 'Reproductive cycles of the domestic bitch', *Anim Reprod Sci*, 124: 200-10.

- Concannon, P. W., and G.B. Digregorio. 1986. 'Canine Vaginal Cytology.' in T.J. Burke (ed.), *Small Animal Reproduction and Infertility* (Lea & Febiger: Philadelphia).
- Concannon, P. W., W. Hansel, and W. J. Visek. 1975. 'The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone', *Biol Reprod*, 13: 112-21.
- Davidson, A. P., and T. W. Baker. 2009. 'Reproductive ultrasound of the bitch and queen', *Top Companion Anim Med*, 24: 55-63.
- de Gier, J., H. S. Kooistra, S. C. Djajadiningrat-Laanen, S. J. Dieleman, and A. C. Okkens. 2006. 'Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17beta, progesterone, prolactin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch', *Theriogenology*, 65: 1346-59.
- Depmann, M., M. J. C. Eijkemans, S. L. Broer, G. J. Scheffer, I. A. J. van Rooij, J. S. E. Laven, and F. J. M. Broekmans. 2016. 'Does anti-Müllerian hormone predict menopause in the general population? Results of a prospective ongoing cohort study', *Human Reproduction*, 31: 1579-87.
- Depmann, M., M. J. C. Eijkemans, S. L. Broer, F. R. Tehrani, M. Solaymani-Dodaran, F. Azizi, C. B. Lambalk, J. F. Randolph, Jr., S. D. Harlow, E. W. Freeman, M. D. Sammel, W. M. M. Verschuren, Y. T. van der Schouw, B. W. Mol, and F. J. M. Broekmans. 2018. 'Does AMH relate to timing of menopause? Results of an Individual Patient Data meta- analysis', *J Clin Endocrinol Metab*.
- Dreier, H.-K. 1975. 'Diagnostische Möglichkeiten mit der Vaginalsmearuntersuchung bei der Hündin', *Kleintierpraxis*, 20: 48-54.
- Durlinger, A. L., J. A. Visser, and A. P. Themmen. 2002. 'Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone', *Reproduction*, 124: 601-9.
- Durlinger, Alexandra L. L., Maria J. G. Gruijters, Piet Kramer, Bas Karels, T. Rajendra Kumar, Martin M. Matzuk, Ursula M. Rose, Frank H. de Jong, Jan Th J. Uilenbroek, J. Anton Grootegoed, and Axel P. N. Themmen. 2001. 'Anti-Müllerian Hormone Attenuates the Effects of FSH on Follicle Development in the Mouse Ovary', *Endocrinology*, 142: 4891-99.
- Durlinger, Alexandra L. L., Piet Kramer, Bas Karels, Frank H. de Jong, Jan Th J. Uilenbroek, J. Anton Grootegoed, and Axel P. N. Themmen. 1999. 'Control of Primordial Follicle Recruitment by Anti-Müllerian Hormone in the Mouse Ovary1', *Endocrinology*, 140: 5789-96.
- El-Sheikh Ali, Hossam, Go Kitahara, Kazumi Nibe, Ryoji Yamaguchi, Yoichiro Horii, Samy Zaabel, and Takeshi Osawa. 2013. 'Plasma anti-Müllerian hormone as a biomarker for bovine granulosa-theca cell tumors: Comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations', *Theriogenology*, 80: 940-49.
- England, G.C.W. 2010. 'Physiology and endocrinology of the female' in England, G.C.W., and A. von Heimendahl (eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology* (British Small Animal Veterinary Association: Quedgeley), 1-12.
- England, G.C.W., and A. von Heimendahl 2010. 'Determining breeding status' in England, G.C.W., and A. von Heimendahl (eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology* (British Small Animal Veterinary Association: Quedgeley), 44-50.
- England, G. C., M. Russo, and S. L. Freeman. 2009. 'Follicular dynamics, ovulation and conception rates in bitches', *Reprod Domest Anim*, 44 Suppl 2: 53-8.
- Feldman, E.C., and R.W. Nelson. 2001. 'Infertility, associated breeding disorders, and disorders of sexual development.' in, *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction* (Saunders: Philadelphia).
- Forest, M. G., P. C. Sizonenko, A. M. Cathiard, and J. Bertrand. 1974. 'Hypophyso-gonadal function in humans during the first year of life. 1. Evidence for testicular activity in early infancy', *J Clin Invest*, 53: 819-28.
- Freeman, E. W., M. D. Sammel, H. Lin, and C. R. Gracia. 2012. 'Anti-müllerian hormone as a predictor of time to menopause in late reproductive age women', *J Clin Endocrinol Metab*, 97: 1673-80.
- Gan, Stephanie D., and Kruti R. Patel. 2013. 'Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay', *Journal of Investigative Dermatology*, 133: 1-3.

- Gharagozlou, F., R. Youssefi, V. Akbarinejad, N. I. Mohammadkhani, and T. Shahpoorzadeh. 2014. 'Anti-Mullerian hormone: a potential biomarker for differential diagnosis of cryptorchidism in dogs', *Vet Rec*, 175: 460.
- Gnoth, C., J. Roos, D. Broomhead, J. Schiffner, E. Godehardt, G. Freundl, and S. Johnson. 2015. 'Anti-mullerian hormone levels and numbers and sizes of antral follicles in regularly menstruating women of reproductive age referenced to true ovulation day', *Fertil Steril*, 104: 1535-43.e1-4.
- Goodman, M. 2001. 'Ovulation timing. Concepts and controversies', *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 31: 219-35, v.
- Grinspon, R. P., and R. A. Rey. 2010. 'Anti-mullerian hormone and sertoli cell function in paediatric male hypogonadism', *Horm Res Paediatr*, 73: 81-92.
- Griesinger, G., K. Dafopoulos, N. Buendgen, I. Cascorbi, P. Georgoulas, A. Zavos, C. I. Messini, and I. E. Messinis. 2012. 'Elimination half-life of anti-Mullerian hormone', *J Clin Endocrinol Metab*, 97: 2160-3.
- Groppetti, D., M. Aralla, V. Bronzo, G. Bosi, A. Pecile, and S. Arrighi. 2015. 'Periovulatory time in the bitch: what's new to know?: Comparison between ovarian histology and clinical features', *Anim Reprod Sci*, 152: 108-16.
- Günzel-Apel, A.-R., and H. Bostedt. 2016. *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze* (Schattauer GmbH: Stuttgart).
- Günzel-Apel, A. Sieme H. Hoppen, H. 1990: Progesteronbestimmung bei der Hündin mittels Mikrotiter – ELISA. *Kleintierpraxis* 35 Jahrg, 473–480.
- Günzel-Apel, A. R., J. Buschhaus, C. Urhausen, C. Masal, K. Wolf, A. Meyer-Lindenberg, M. Piechotta, M. Beyerbach, and H. A. Schoon. 2012. 'Klinische Symptomatik, diagnostische Vorgehensweise und Therapie beim so genannten Ovarrest-Syndrom der Hündin', *Tierärztliche Praxis Kleintiere*, 40: 35-42.
- Günzel-Apel, A.-R. 2016a. 'Neuroendokrine Steuerung des Zyklus.' in A.-R. Günzel-Apel and H. Bostedt (eds.), *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze* (Schattauer: Stuttgart), 10-12.
- Günzel-Apel, A.-R. 2016b. 'Sexualzyklus.' in A.-R. Günzel-Apel and H. Bostedt (eds.), *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze* (Schattauer: Stuttgart), 5-7.
- Günzel-Apel, A.-R. 2016c. 'Unvollständige Kastration.' in A.-R. Günzel-Apel and H. Bostedt (eds.), *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze* (Schattauer: Stuttgart), 66-73.
- Guzel, Y., Y. A. Aba, K. Yakin, and O. Oktem. 2017. 'Menstrual cycle characteristics of young females with occult primary ovarian insufficiency at initial diagnosis and one-year follow-up with serum amh level and antral follicle count', *PLoS One*, 12: e0188334.
- Hansen, K. R., G. M. Hodnett, N. Knowlton, and L. B. Craig. 2011. 'Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number', *Fertil Steril*, 95: 170-5.
- Heaps, L. A., C. J. Scudder, V. J. Lipscomb, S. M. Steinbach, S. L. Priestnall, H. Martineau, B. Szladovits, R. C. Fowkes, and O. A. Garden. 2017. 'Serum anti-Mullerian hormone concentrations before and after treatment of an ovarian granulosa cell tumour in a cat', *JFMS Open Rep*, 3: 2055116917722701.
- Hirobe, S., W. W. He, M. M. Lee, and P. K. Donahoe. 1992. 'Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity', *Endocrinology*, 131: 854-62.
- Hoffmann, B., R. Hoveler, S. H. Hasan, and K. Failing. 1992. 'Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy', *J Reprod Fertil*, 96: 837-45.
- Hollinshead, F. K., C. Walker, and D. W. Hanlon. 2017. 'Determination of the normal reference interval for anti-Mullerian hormone (AMH) in bitches and use of AMH as a potential predictor of litter size', *Reprod Domest Anim*, 52 Suppl 2: 35-40.
- Holst, B. S. 2017. 'Diagnostic possibilities from a serum sample-Clinical value of new methods within small animal reproduction, with focus on anti-Mullerian hormone', *Reprod Domest Anim*, 52 Suppl 2: 303-09.

- Holst, B. S., and U. Dreimanis. 2015. 'Anti-Mullerian hormone: a potentially useful biomarker for the diagnosis of canine Sertoli cell tumours', *BMC Vet Res*, 11: 166.
- Holst, P. A., and R. D. Phemister. 1974. 'Onset of diestrus in the Beagle bitch: definition and significance', *Am J Vet Res*, 35: 401-6.
- Hornakova, L., T. Vrbovska, M. Pavl'ak, A. Valencakova-Agyagosova, M. Halo, and J. Hajurka. 2017. 'The evaluation of blood concentrations of testosterone, 17beta-oestradiol and anti-Mullerian hormone in dogs with cryptorchidism and testicular tumours', *Pol J Vet Sci*, 20: 677-85.
- Jöchle, W., and A. C. Andersen. 1977. 'The estrous cycle in the dog: a review', *Theriogenology*, 7: 113-40.
- Johnston, S.D., M.V. Root Kustritz, and P.N.S. Olson. 2001. *Canine and Feline Theriogenology* (Saunders: Philadelphia).
- Kevenaar, M. E., M. F. Meerasahib, P. Kramer, B. M. van de Lang-Born, F. H. de Jong, N. P. Groome, A. P. Themmen, and J. A. Visser. 2006. 'Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice', *Endocrinology*, 147: 3228-34.
- Kindt, Thomas. 2007. 'Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)' in Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B. (eds.), *Immunology* (Freeman: New York).
- Kitahara, G., H. El-Sheikh Ali, T. Sato, I. Kobayashi, K. Hemmi, Y. Shirao, and S. Kamimura. 2012. 'Anti-Mullerian hormone (AMH) profiles as a novel biomarker to evaluate the existence of a functional cryptorchid testis in Japanese Black calves', *J Reprod Dev*, 58: 310-5.
- Kooistra, H. S., A. C. Okkens, M. M. Bevers, C. Popp-Snijders, B. van Haften, S. J. Dieleman, and J. Schoemaker. 1999. 'Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in beagle bitches', *Biol Reprod*, 60: 65-71.
- Kowalewski, M. P., S. Ihle, M. J. Siemieniuch, A. Gram, A. Boos, S. Zdunczyk, J. Fingerhut, B. Hoffmann, G. Schuler, A. Jurczak, A. Domoslawska, and T. Janowski. 2015. 'Formation of the early canine CL and the role of prostaglandin E2 (PGE2) in regulation of its function: an in vivo approach', *Theriogenology*, 83: 1038-47.
- Kreeger, T. J., and U. S. Seal. 1992. 'Circannual prolactin rhythm in intact dogs housed outdoors', *Chronobiologia*, 19: 1-8.
- Lang, Gudrun. 2006. 'Immunhistochemie.' in, *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik* (Springer Vienna: Vienna).
- Lee, M. M., P. K. Donahoe, B. L. Silverman, T. Hasegawa, Y. Hasegawa, M. L. Gustafson, Y. C. Chang, and D. T. MacLaughlin. 1997. 'Measurements of serum mullerian inhibiting substance in the evaluation of children with nonpalpable gonads', *N Engl J Med*, 336: 1480-6.
- Lie Fong, S., J. A. Visser, C. K. Welt, Y. B. de Rijke, M. J. Eijkemans, F. J. Broekmans, E. M. Roes, W. H. Peters, A. C. Hokken-Koelega, B. C. Fauser, A. P. Themmen, F. H. de Jong, I. Schipper, and J. S. Laven. 2012. 'Serum anti-mullerian hormone levels in healthy females: a nomogram ranging from infancy to adulthood', *J Clin Endocrinol Metab*, 97: 4650-5.
- Lin, W. Q., L. N. Yao, D. X. Zhang, W. Zhang, X. J. Yang, and R. Yu. 2013. 'The predictive value of anti-Mullerian hormone on embryo quality, blastocyst development, and pregnancy rate following in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET)', *J Assist Reprod Genet*, 30: 649-55.
- Lofstedt, R. M., and J. A. Vanleeuwen. 2002. 'Evaluation of a commercially available luteinizing hormone test for its ability to distinguish between ovariectomized and sexually intact bitches', *J Am Vet Med Assoc*, 220: 1331-5.
- Manothaiudom, K., S. D. Johnston, R. L. Hegstad, and S. K. Hardy. 1995. 'Evaluation of the ICAGEN-Target canine ovulation timing diagnostic test in detecting canine plasma progesterone concentrations', *J Am Anim Hosp Assoc*, 31: 57-64.
- Mellin, T. N., G. P. Orczyk, M. Hichens, and H. R. Behrman. 1976. 'Serum profiles of luteinizing hormone, progesterone and total estrogens during the canine estrous cycle', *Theriogenology*, 5: 175-87.

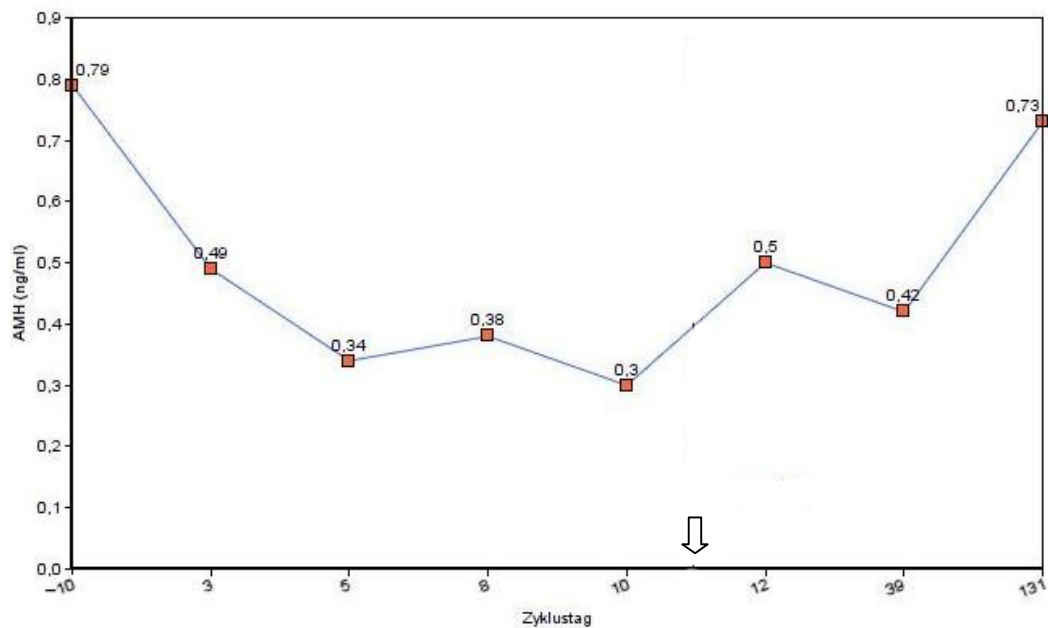
- Meyers-Wallen, V. N., T. F. Manganaro, T. Kuroda, P. W. Concannon, D. T. MacLaughlin, and P. K. Donahoe. 1991. 'The critical period for mullerian duct regression in the dog embryo', *Biol Reprod*, 45: 626-33.
- Monniaux, D., C. Rico, H. Larroque, R. Dalbies-Tran, C. Medigue, F. Clement, and S. Fabre. 2010. '[Anti-Mullerian hormone, an endocrine predictor of the response to ovarian stimulation in the bovine species]', *Gynecol Obstet Fertil*, 38: 465-70.
- Nabenishi, H., G. Kitahara, S. Takagi, A. Yamazaki, and T. Osawa. 2017. 'Relationship between plasma anti-Müllerian hormone concentrations during the rearing period and subsequent embryo productivity in Japanese black cattle', *Domestic Animal Endocrinology*, 60: 19-24.
- Nagashima, J. B., B. S. Hansen, N. Songsasen, A. J. Travis, and N. J. Place. 2016. 'Anti-Mullerian Hormone in the Domestic Dog during the Anestrus to Oestrous Transition', *Reprod Domest Anim*, 51: 158-64.
- Okkens, A. C., S. J. Dieleman, M. M. Bevers, A. A. Lubberink, and A. H. Willemse. 1986. 'Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog', *J Reprod Fertil*, 77: 187-92.
- Olson, P. N., R. A. Bowen, M. D. Behrendt, J. D. Olson, and T. M. Nett. 1982. 'Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus', *Biol Reprod*, 27: 1196-206.
- Olson, P.N. 1984. 'Concentrations of progesterone and luteinizing hormone in the serum of diestrous bitches before and after hysterectomy', *Am J Vet Res*, 45: 149-53.
- Olson, P. N., P. W. Husted, T. A. Allen, and T. M. Nett. 1984. 'Reproductive endocrinology and physiology of the bitch and queen', *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 14: 927-46.
- Olson, P. N., M. V. Kustritz, and S. D. Johnston. 2001. 'Early-age neutering of dogs and cats in the United States (a review)', *J Reprod Fertil Suppl*, 57: 223-32.
- Padmanabhan, V., and A. S. McNeilly. 2001. 'Is there an FSH-releasing factor?', *Reproduction*, 121: 21-30.
- Pasqualini, T., H. Chemes, and M. A. Rivarla. 1981. 'Testicular testosterone levels during puberty in cryptorchidism', *Clin Endocrinol (Oxf)*, 15: 545-54.
- Perez, C. C., I. Rodriguez, J. Dorado, and M. Hidalgo. 2005. 'Use of ultrafast Papanicolaou stain for exfoliative vaginal cytology in bitches', *Vet Rec*, 156: 648-50.
- Phemister, R. D., P. A. Holst, J. S. Spano, and M. L. Hopwood. 1973. 'Time of ovulation in the beagle bitch', *Biol Reprod*, 8: 74-82.
- Pir Yagci, I., M. Pekcan, I. M. Polat, H. Kalender, and H. C. Macun. 2016. 'Does serum anti-Mullerian hormone levels always discriminate presence of the ovaries in adult bitches? Comparison of two ELISA kits', *Reprod Domest Anim*, 51: 910-15.
- Place, N. J., B. S. Hansen, J. L. Cheraskin, S. E. Cudney, J. A. Flanders, A. D. Newmark, B. Barry, and J. M. Scarlett. 2011. 'Measurement of serum anti-Mullerian hormone concentration in female dogs and cats before and after ovariohysterectomy', *J Vet Diagn Invest*, 23: 524-7.
- Polisca, A., R. Zelli, A. Troisi, R. Orlandi, G. Brecchia, and C. Boiti. 2013. 'Power and pulsed Doppler evaluation of ovarian hemodynamic changes during diestrus in pregnant and nonpregnant bitches', *Theriogenology*, 79: 219-24.
- Post, K. 1985. 'Canine vaginal cytology during the estrous cycle', *Can Vet J*, 26: 101-4.
- Rey, R. A., C. Lhomme, I. Marcillac, N. Lahlou, P. Duvillard, N. Josso, and J. M. Bidart. 1996. 'Antimullerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of the ovary: comparative study with serum alpha-inhibin and estradiol', *Am J Obstet Gynecol*, 174: 958-65.
- Rey, R., I. Lordereau-Richard, J. C. Carel, P. Barbet, R. L. Cate, M. Roger, J. L. Chaussain, and N. Josso. 1993. 'Anti-mullerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development', *J Clin Endocrinol Metab*, 77: 1220-6.
- Rey, R., C. Lukas-Croisier, C. Lasala, and P. Bedecarras. 2003. 'AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation', *Mol Cell Endocrinol*, 211: 21-31.

- Rey, Rodolfo, Jean-Christophe Sabourin, Marcela Venara, Wen-Qing Long, Francis Jaubert, W. Patrick Zeller, Pierre Duvillard, Héctor Chemes, and Jean-Michel Bidart. 2000. 'Anti-Müllerian hormone is a specific marker of Sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors', *Human Pathology*, 31: 1202-08.
- Rico, C., L. Drouilhet, P. Salvetti, R. Dalbies-Tran, P. Jarrier, J. L. Touze, E. Pillet, C. Ponsart, S. Fabre, and D. Monniaux. 2012. 'Determination of anti-Mullerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryo production: from the laboratory to the farm', *Reprod Fertil Dev*, 24: 932-44.
- Rico, C., C. Medigue, S. Fabre, P. Jarrier, M. Bontoux, F. Clement, and D. Monniaux. 2011. 'Regulation of anti-Mullerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels', *Biol Reprod*, 84: 560-71.
- Rieck, G.W., and K. Kratzheller. 1955. 'Zytologie des desquamierenden Vaginalepithels der Hündin und ihre Anwendung für die Zyklusdiagnostik', *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, 2(1): 82-101.
- Rohlertz, M., B. Strom Holst, and E. Axner. 2012. 'Comparison of the GnRH-stimulation test and a semiquantitative quick test for LH to diagnose presence of ovaries in the female domestic cat', *Theriogenology*, 78: 1901-6.
- Röttger, K. 2010. 'Untersuchungen zur Durchführung der exfoliativen Vaginalzytologie bei der Hündin - Ein Beitrag zur Standardisierung dieser diagnostischen Methode ', Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Schnorr, B., and M. Kressin. 1989. *Embryologie der Haustiere* (Enke Verlag: Stuttgart).
- Smeenk, J. M., F. C. Sweep, G. A. Zielhuis, J. A. Kremer, C. M. Thomas, and D. D. Braat. 2007. 'Antimullerian hormone predicts ovarian responsiveness, but not embryo quality or pregnancy, after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection', *Fertil Steril*, 87: 223-6.
- Souza, A. H., P. D. Carvalho, A. E. Rozner, L. M. Vieira, K. S. Hackbart, R. W. Bender, A. R. Dresch, J. P. Verstegen, R. D. Shaver, and M. C. Wiltbank. 2015. 'Relationship between circulating anti-Mullerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows', *J Dairy Sci*, 98: 169-78.
- Sowers, M. R., A. D. Eyvazzadeh, D. McConnell, M. Yosef, M. L. Jannausch, D. Zhang, S. Harlow, and J. F. Randolph, Jr. 2008. 'Anti-mullerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition', *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 3478-83.
- Suter, P.F., B. Kohn, and G. Schwarz. 2012. *Praktikum der Hundeklinik* (Enke Verlag: Stuttgart).
- Themmen, A. P., B. Kalra, J. A. Visser, A. Kumar, G. Savjani, J. de Gier, and S. Jaques. 2016. 'The use of anti-Mullerian hormone as diagnostic for gonadectomy status in dogs', *Theriogenology*, 86: 1467-74.
- Tran, D., J. Y. Picard, J. Campargue, and N. Josso. 1987. 'Immunocytochemical detection of anti-mullerian hormone in Sertoli cells of various mammalian species including human', *J Histochem Cytochem*, 35: 733-43.
- Turna Yilmaz, O., T. S. Toydemir, I. Kirsan, Z. Gunay Ucmak, and E. Caliskan Karacam. 2015. 'Anti-Mullerian hormone as a diagnostic tool for ovarian remnant syndrome in bitches', *Vet Res Commun*, 39: 159-62.
- van Klaveren, N. J., H. S. Kooistra, S. J. Dieleman, H. A. van Lith, and A. C. Schaeffers-Okkens. 2001. '[The optimal mating time in the bitch based on the progesterone concentration in peripheral blood. A comparison of reliability between three ELISA test kits and a 125-iodine radioimmunoassay]', *Tijdschr Diergeneeskde*, 126: 680-5.
- van Rooij, I. A. J., F. J. M. Broekmans, E. R. te Velde, B. C. J. M. Fauser, L. F. J. M. M. Bancsi, F. H. de Jong, and A. P. N. Themmen. 2002. 'Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve', *Human Reproduction*, 17: 3065-71.
- Vernunft, A., M. Schwerhoff, T. Viergutz, M. Diederich, and A. Kuwer. 2015. 'Anti-Muellerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes', *J Reprod Dev*, 61: 74-9.

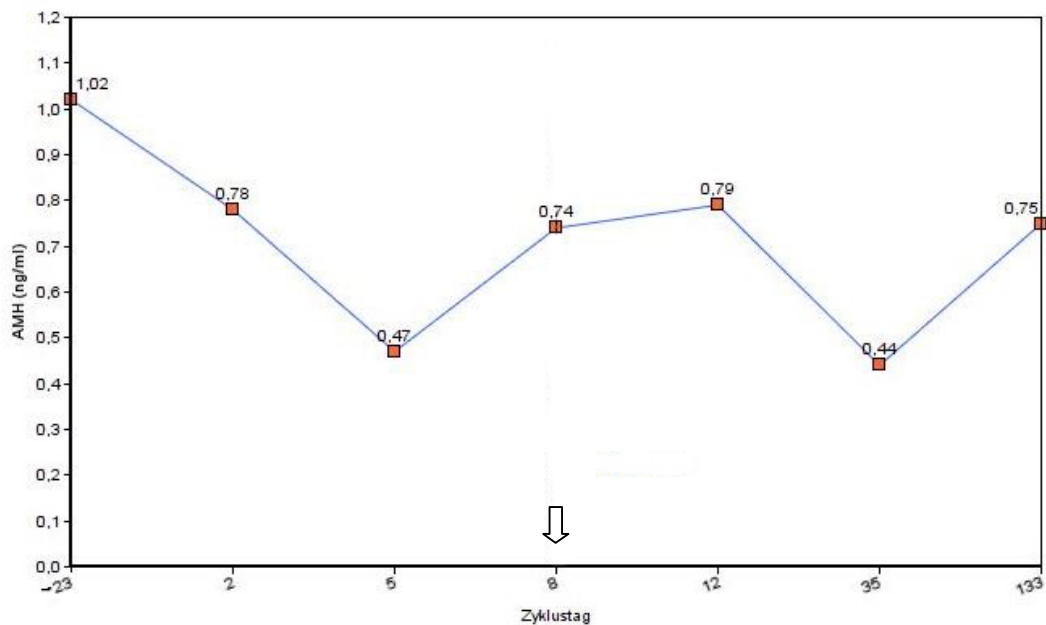
- Vigier, B., D. Tran, F. du Mesnil du Buisson, Y. Heyman, and N. Josso. 1983. 'Use of monoclonal antibody techniques to study the ontogeny of bovine anti-Müllerian hormone', *J Reprod Fertil*, 69: 207-14.
- Visser, Jenny A, Frank H de Jong, Joop S E Laven, and Axel P N Themmen. 2006. 'Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function', *Reproduction*, 131: 1-9.
- von Engelhardt, W., and G. Breves. 2010. *Physiologie der Haustiere* (Enke Verlag: Stuttgart).
- Wallace, M. S. 1991. 'The ovarian remnant syndrome in the bitch and queen', *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 21: 501-7.
- Walter, B., A. Coelfen, K. Jager, S. Reese, A. Meyer-Lindenberg, and H. Aupperle-Lellbach. 2018. 'Anti-Müllerian hormone concentration in bitches with histopathologically diagnosed ovarian tumours and cysts', *Reprod Domest Anim*, 53: 784-92.
- Walter, B., Feulner, H., Otdorff, C., Klein, R., Reese, S., Meyer-Lindenberg, A. 2019 'Changes in anti-müllerian hormone concentrations in bitches throughout the oestrus cycle', *Theriogenology* 127: 114-119
- Weenen, C., J. S. Laven, A. R. Von Bergh, M. Cranfield, N. P. Groome, J. A. Visser, P. Kramer, B. C. Fauser, and A. P. Themmen. 2004. 'Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment', *Mol Hum Reprod*, 10: 77-83.
- Wehrend, A. 2010. *Leitsymptome Gynäkologie und Geburtshilfe beim Hund* (Enke Verlag: Stuttgart).
- Wehrend, A., K. von Plato, and S. Goericke-Pesch. 2013. 'Die exfoliative Vaginalzytologie bei der Hündin – Indikationen, Durchführung, Interpretation', *Tierärztliche Praxis Kleintiere*, 41: 267-74.
- Wright, P. J., and B. W. Parry. 1989. 'Cytology of the canine reproductive system', *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 19: 851-74.
- Zarek, S. M., E. M. Mitchell, L. A. Sjaarda, S. L. Mumford, R. M. Silver, J. B. Stanford, N. Galai, M. V. White, K. C. Schliep, A. H. DeCherney, and E. F. Schisterman. 2015. 'Is Anti-Müllerian Hormone Associated With Fecundability? Findings From the EAGeR Trial', *J Clin Endocrinol Metab*, 100: 4215-21.



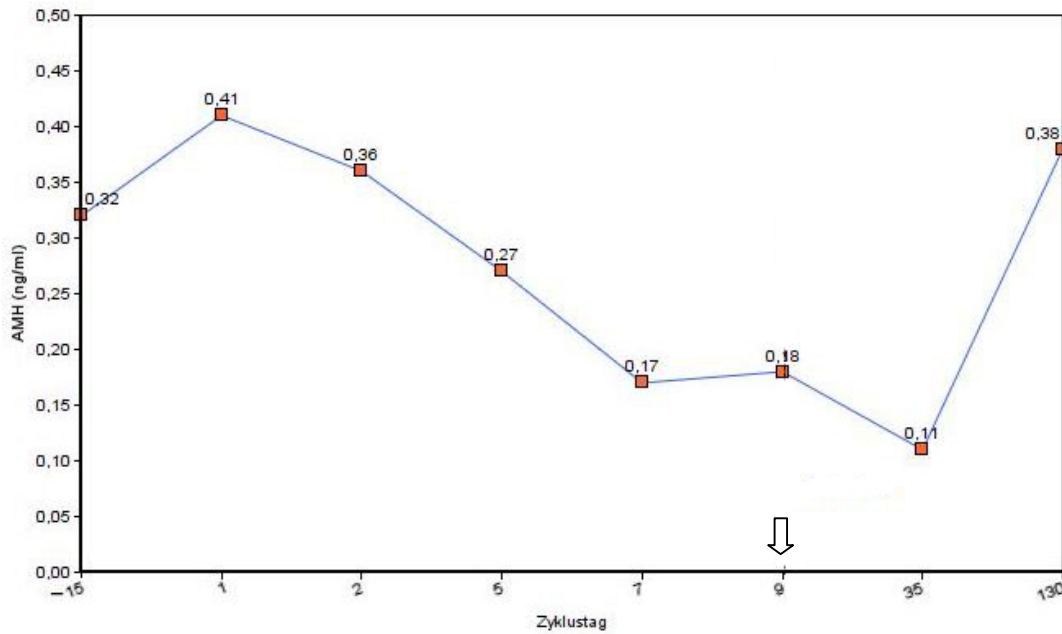
## Anhang



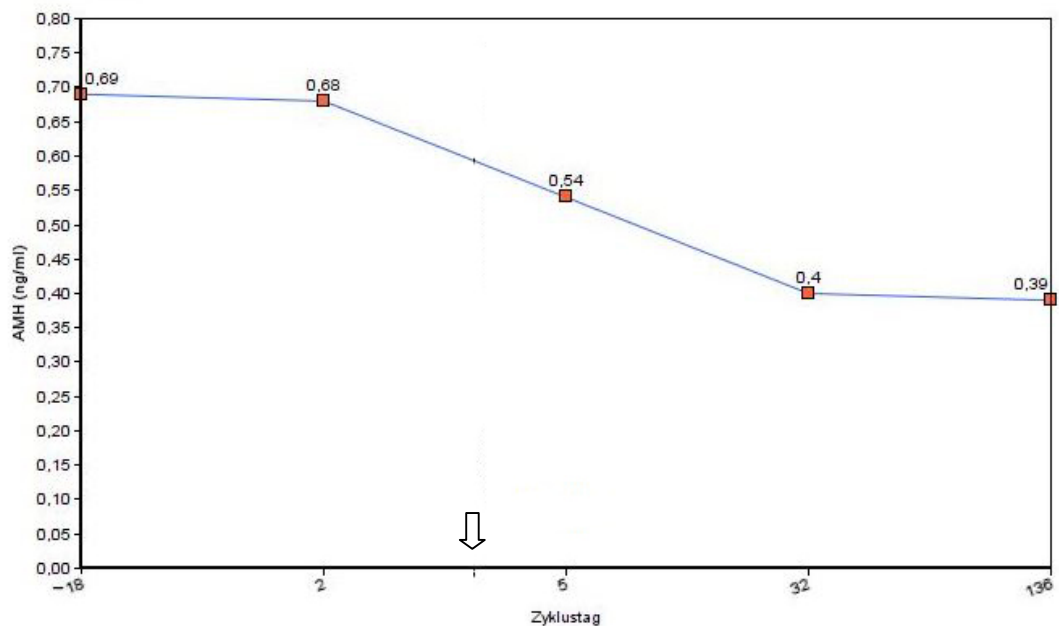
**Abb. 1:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Lola“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.



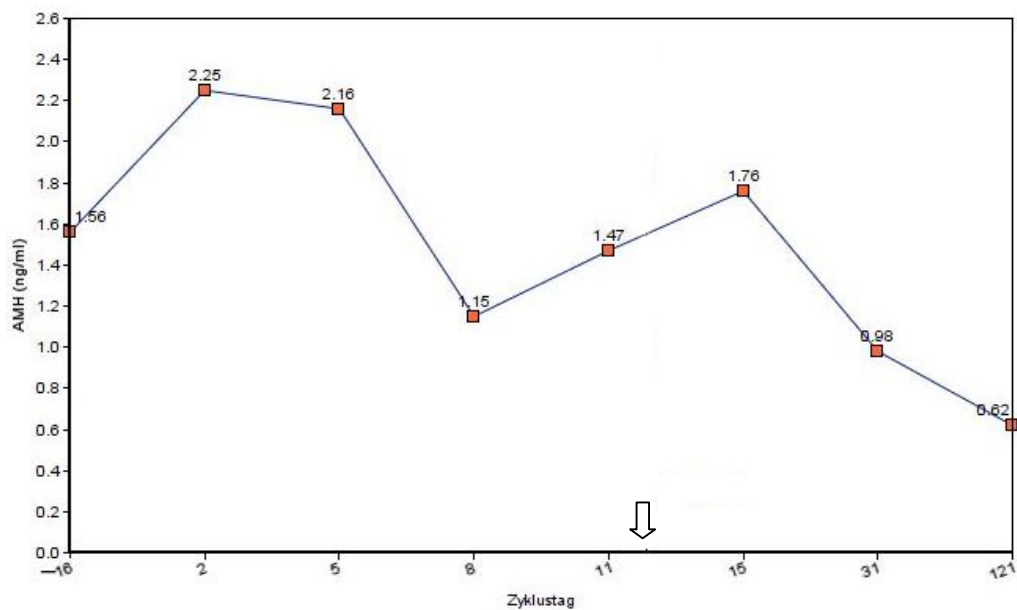
**Abb. 2:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Lima“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.



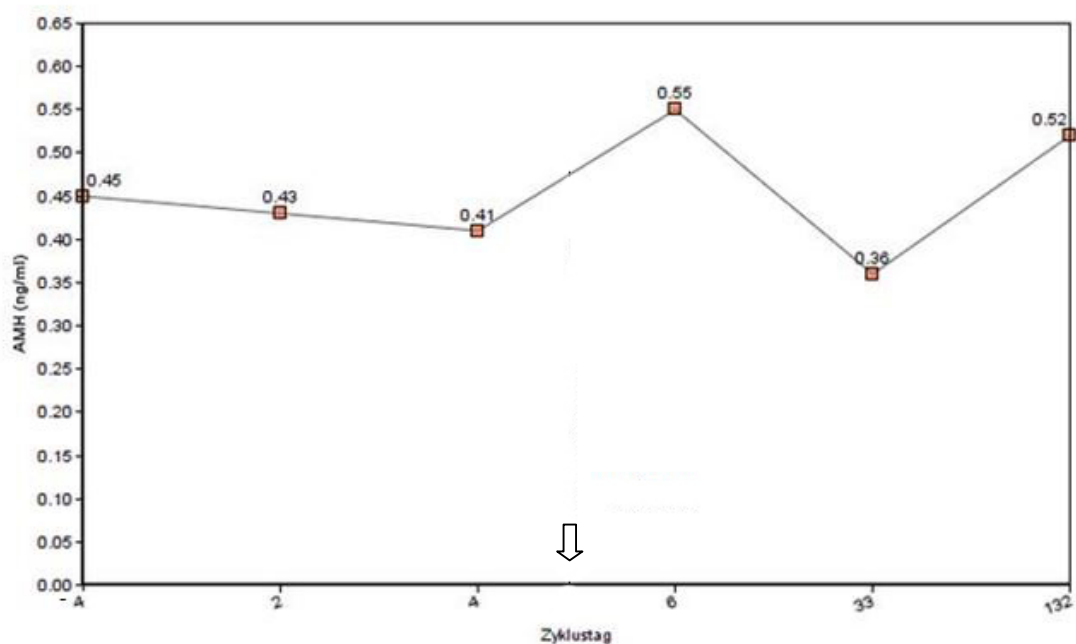
**Abb. 3:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Birdie“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.



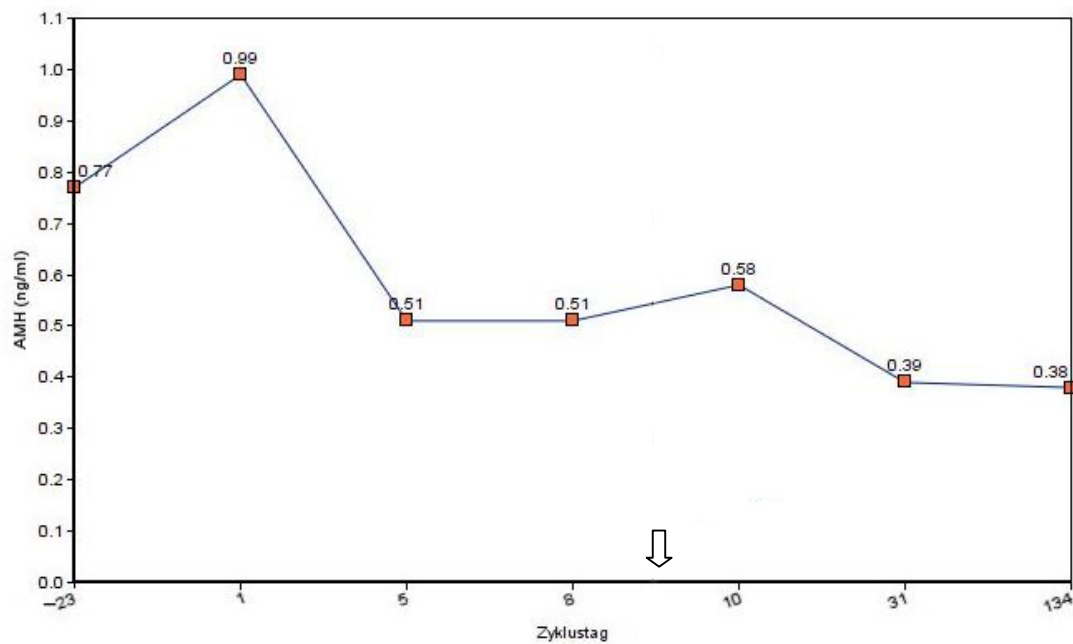
**Abb. 4:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Gretchen“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.



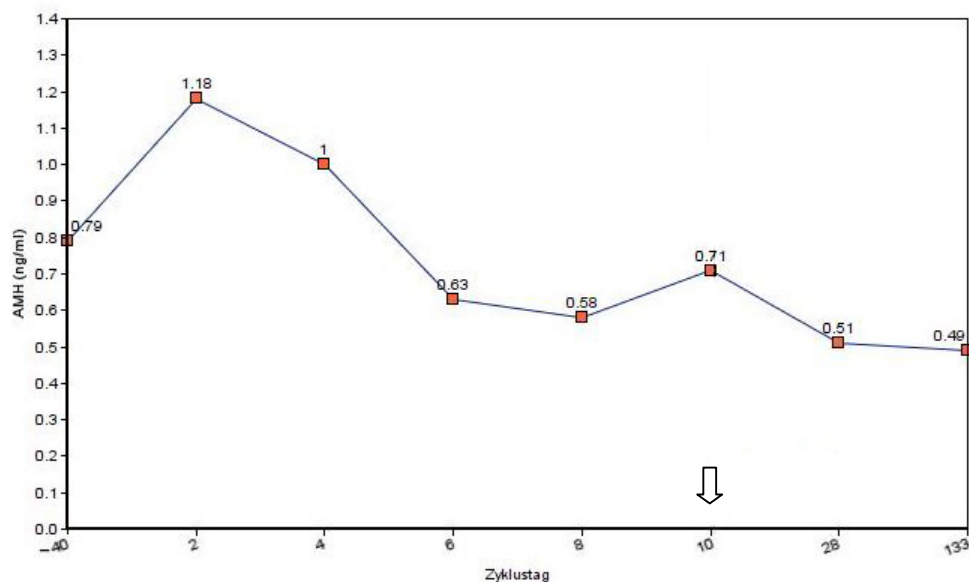
**Abb. 5:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Amidala“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.



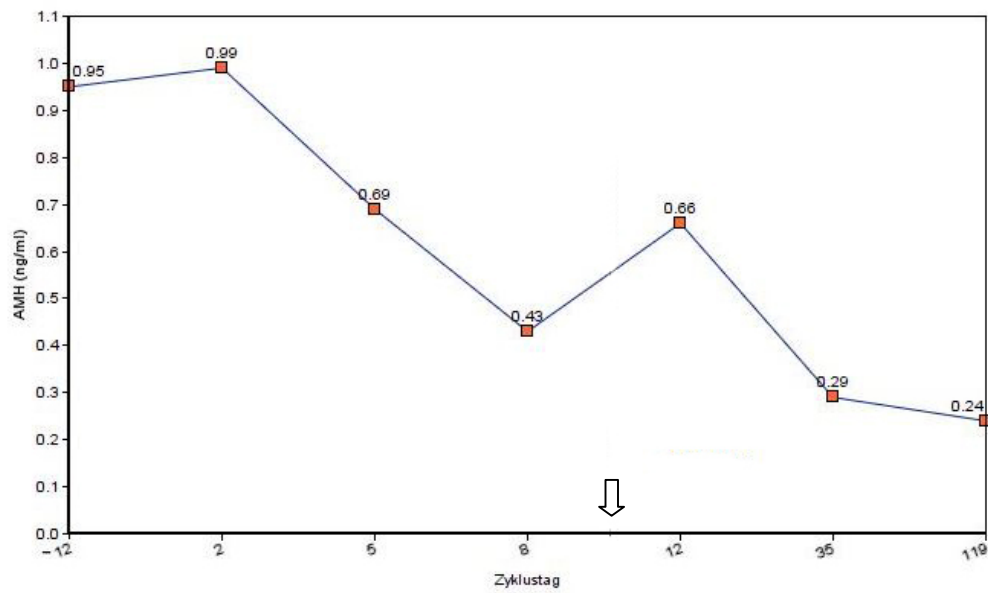
**Abb. 6:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Frieda“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.



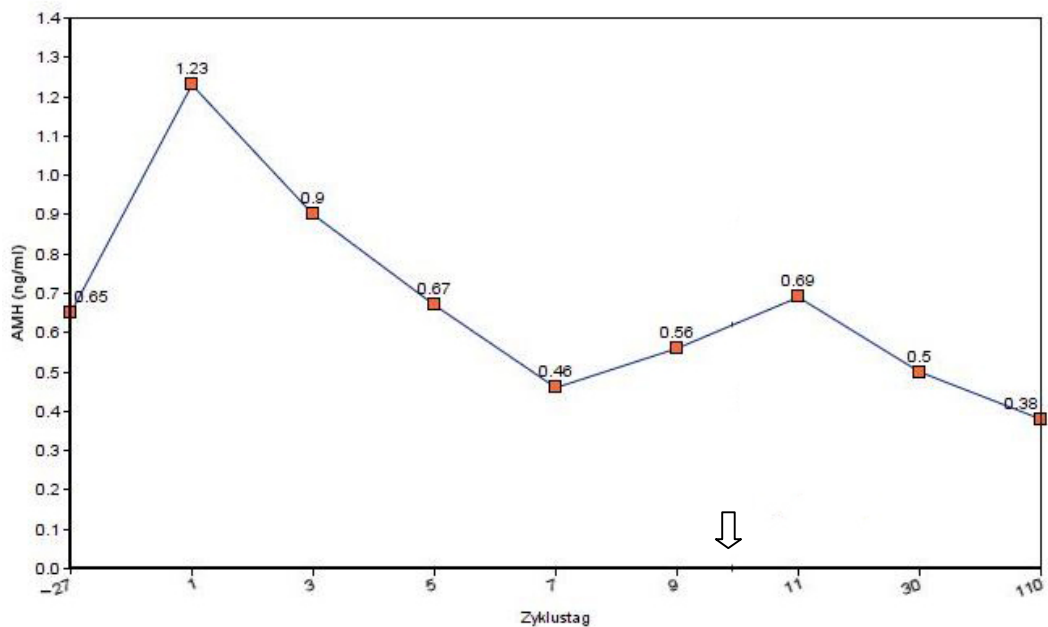
**Abb. 7:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Abby“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.



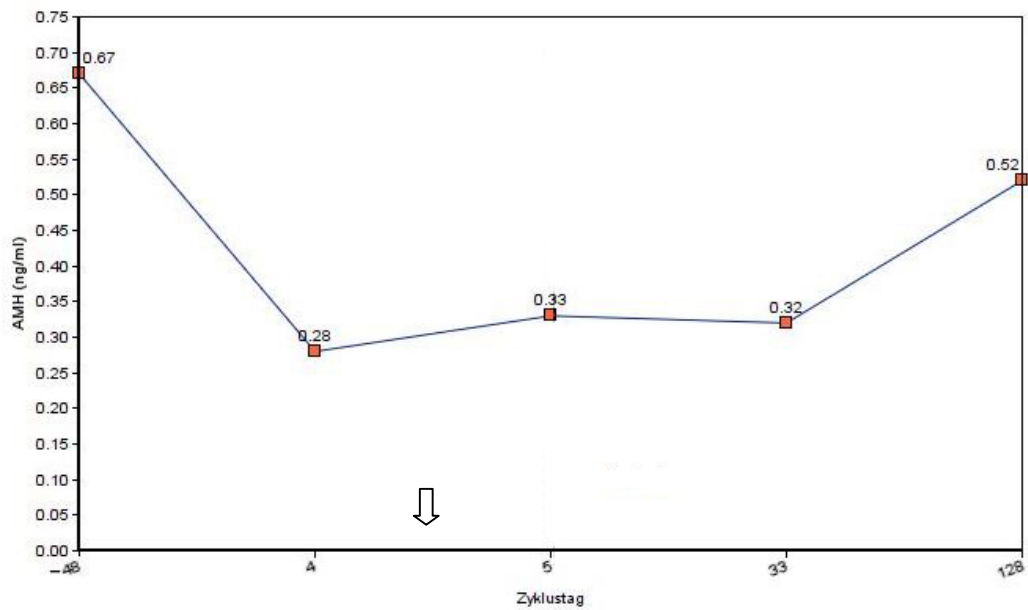
**Abb. 8:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Aura“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.



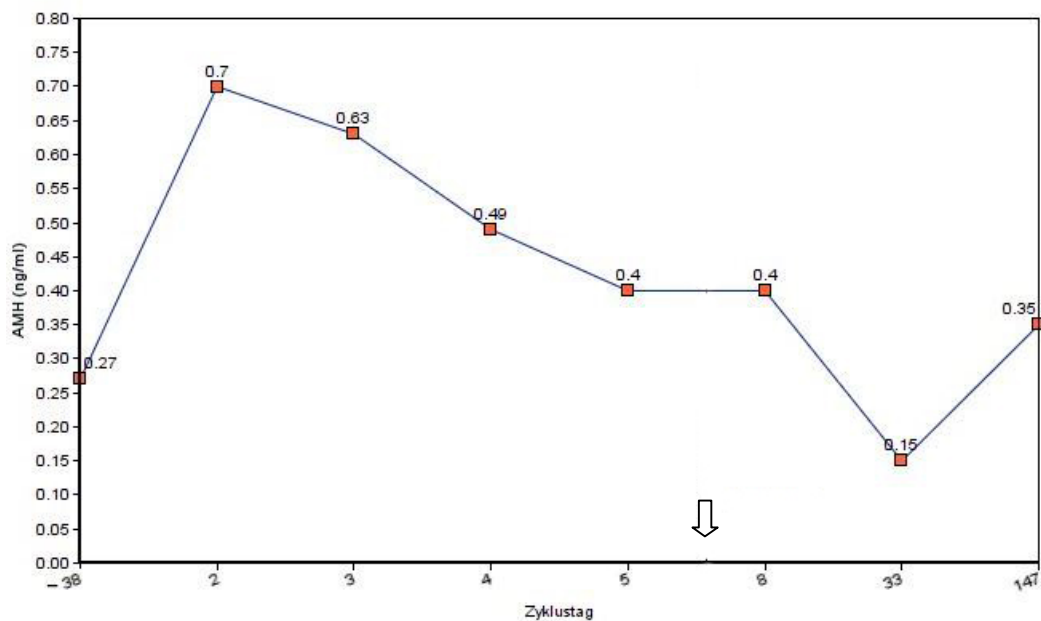
**Abb. 9:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Hoppala“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. Zeitpunkt der Ovulation: ↓



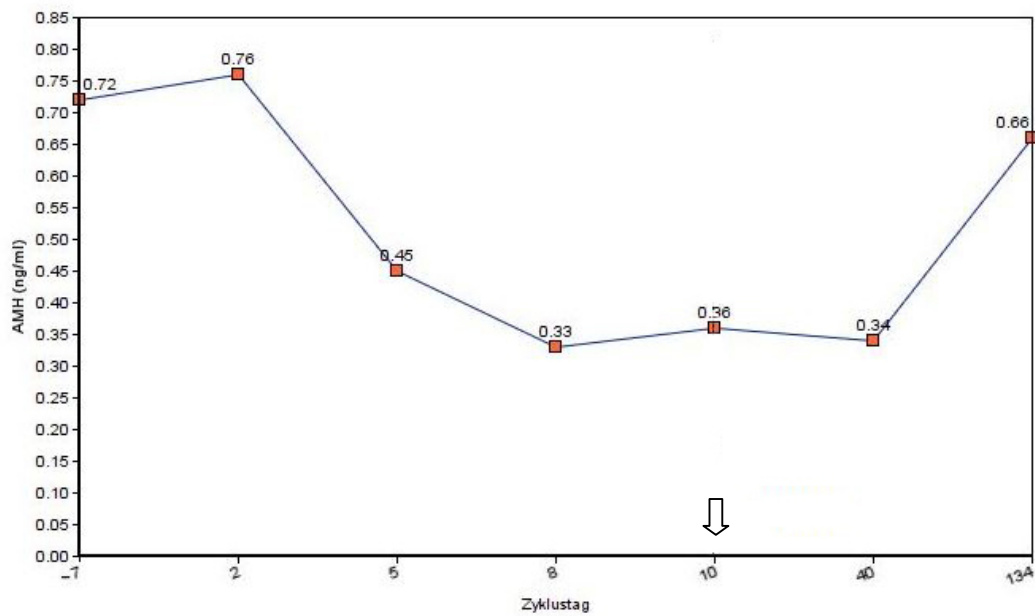
**Abb. 10:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Myrte“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.



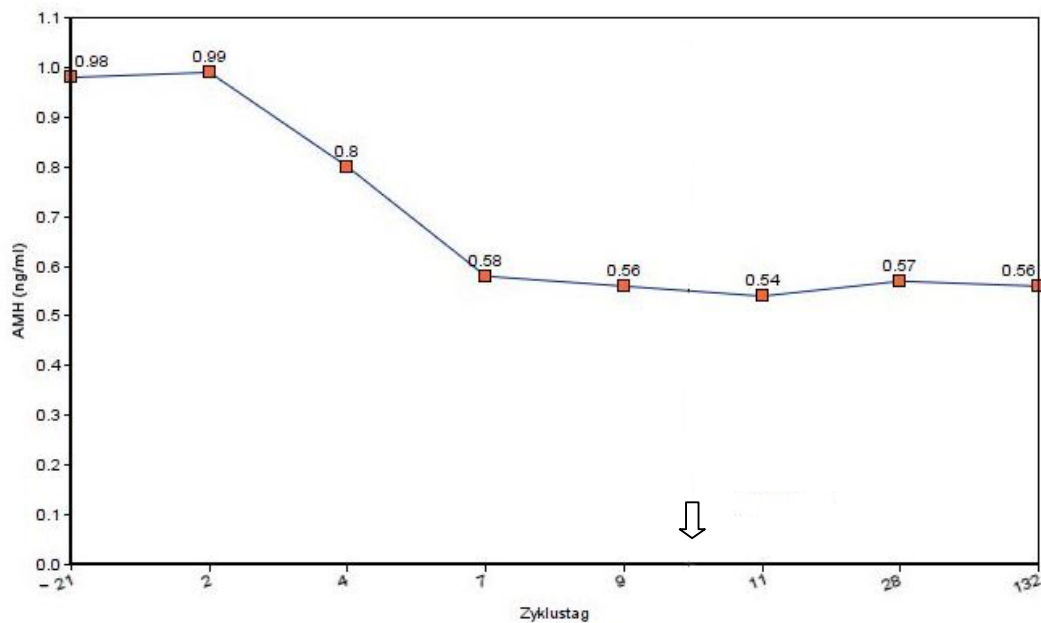
**Abb. 11:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „April“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.



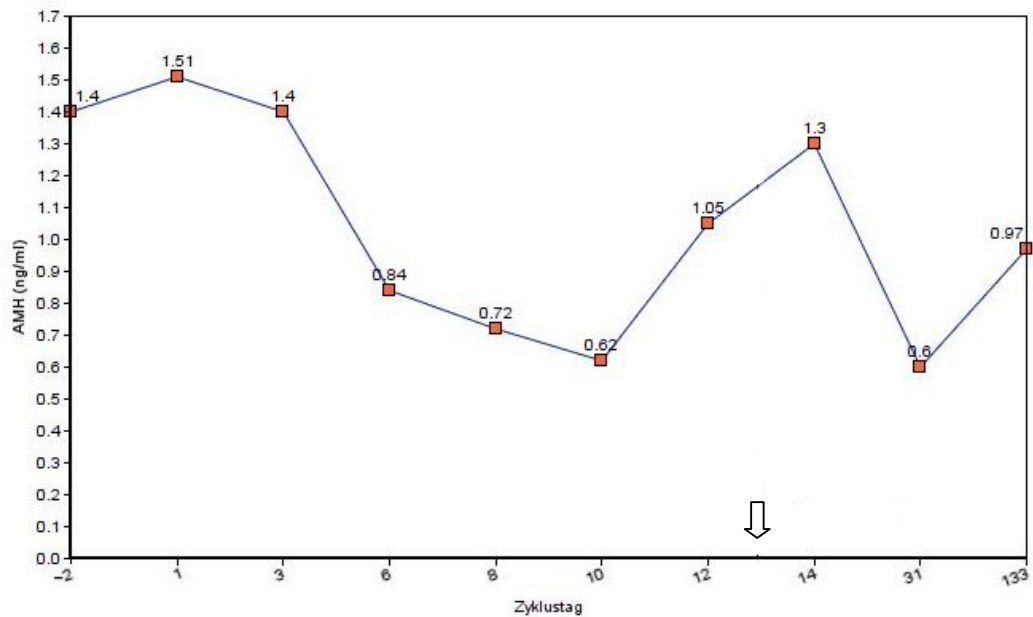
**Abb. 12:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Stöpsel“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.



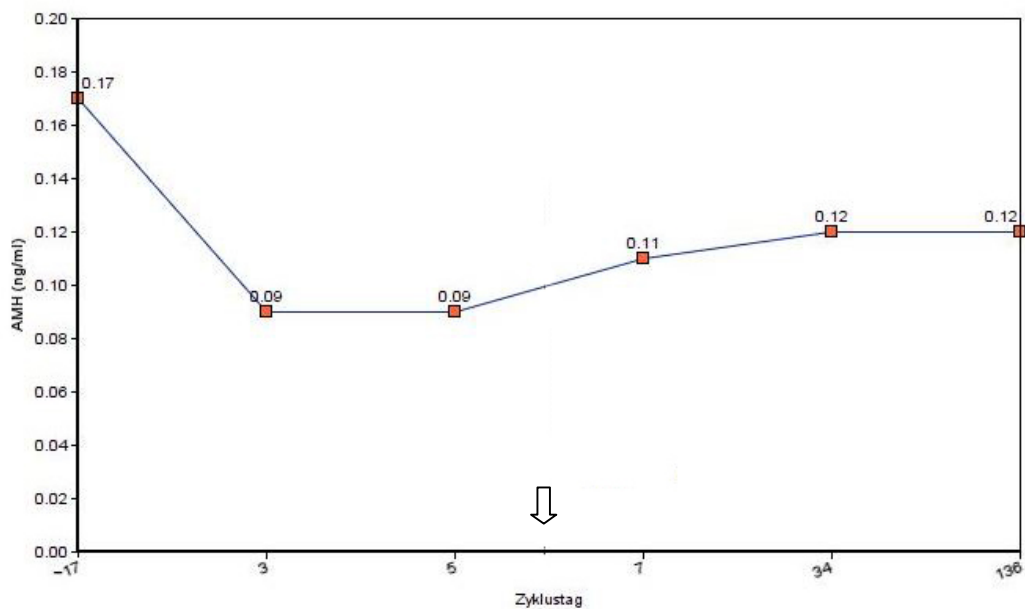
**Abb.13:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Fanny“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.



**Abb. 14:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Batida“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.

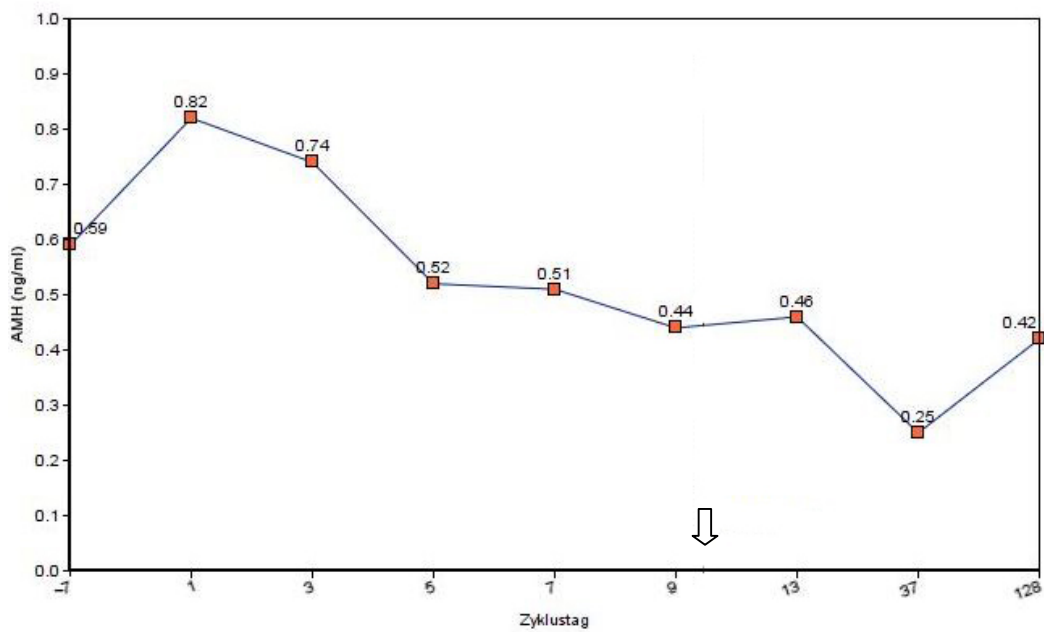


**Abb. 15:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Lotte“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.

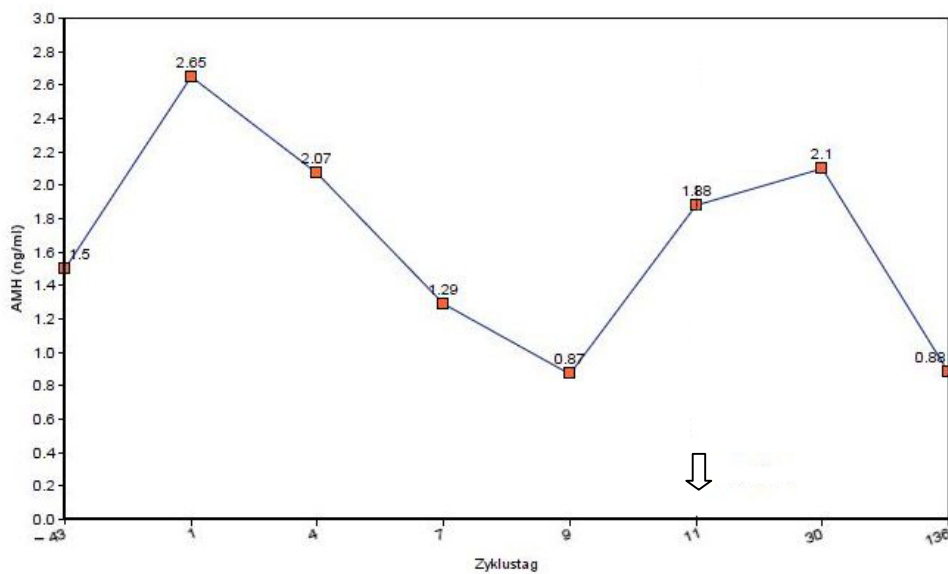


**Abb. 16:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Fine“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.

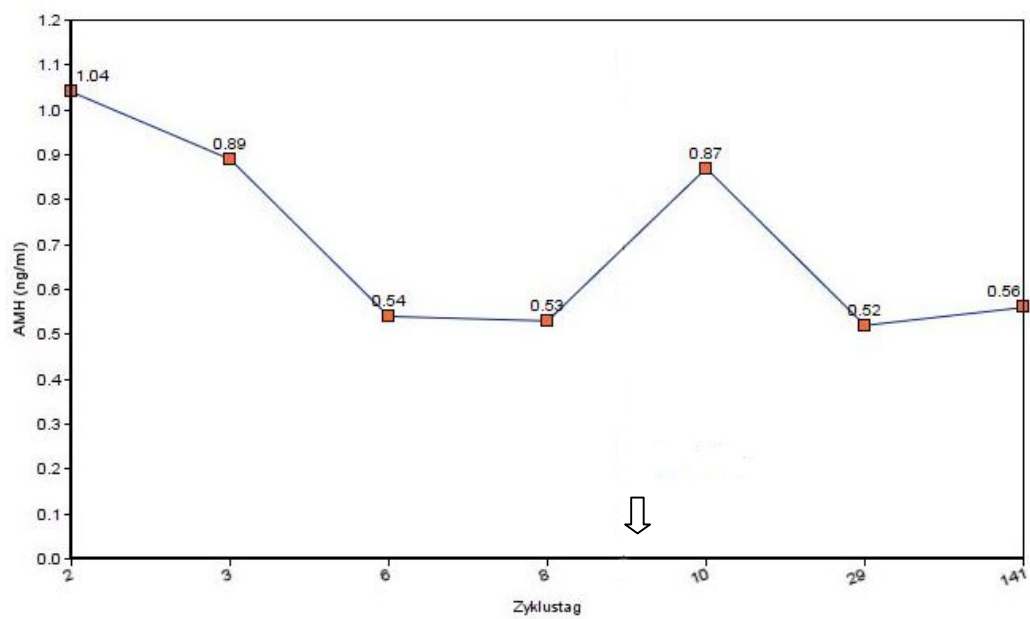




**Abb. 17:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Irmi“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.



**Abb. 18:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Hermine“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.



**Abb. 19:** Darstellung des AMH-Konzentrationsverlaufs der Hündin „Dina“ über den Zyklus als Strichdiagramm. Zyklustag 1 entspricht dem ersten Tag der Läufigkeit. X-Achse: Zyklustag. Y-Achse: AMH-Konzentration in ng/ml. □ Kennzeichnung der Messzeitpunkte. ↓ Zeitpunkt der Ovulation.

**Tabelle 1:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Lola“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums.

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
-10	0,79	Später Anöstrus
3	0,49	Proöstrus
5	0,34	Proöstrus
8	0,38	Östrus
10	0,3	Östrus - prä ov.
12	0,5	Östrus – post ov.
39	0,42	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
131	0,73	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 2:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Lima“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
-23	1,02	Später Anöstrus
2	0,78	Proöstrus
5	0,47	Proöstrus
8	0,74	Östrus – ov.
12	0,79	Östrus – post ov.
35	0,44	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
133	0,75	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 3:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Birdie“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
-15	0,32	Später Anöstrus
1	0,41	Proöstrus
2	0,36	Proöstrus
5	0,27	Östrus - prä ov.
7	0,17	Östrus - prä ov.
9	0,18	Östrus – ov.
35	0,11	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
130	0,38	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 4:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Gretchen“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
-18	0,69	Später Anöstrus
2	0,68	Proöstrus
5	0,54	Östrus – post ov.
32	0,4	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
136	0,39	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 5:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Amidala“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
-16	1,56	Später Anöstrus
2	2,25	Proöstrus
5	2,16	Proöstrus
8	1,15	Proöstrus
11	1,47	Östrus - prä ov.
15	1,76	Östrus - post ov.
31	0,98	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
121	0,62	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 6:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Frieda“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
-4	0,45	Später Anöstrus
2	0,43	Östrus
4	0,41	Östrus
6	0,55	Östrus – post ov.
33	0,36	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
132	0,52	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 7:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Abby“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
-23	0,77	Später Anöstrus
1	0,99	Proöstrus
5	0,51	Proöstrus
8	0,51	Östrus – prä ov.
10	0,58	Östrus – post ov.
31	0,39	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
134	0,38	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 8:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Aura“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
-40	0,79	Später Anöstrus
2	1,18	Proöstrus
4	1	Proöstrus
6	0,63	Proöstrus
8	0,58	Östrus
10	0,71	Östrus – Ov.
28	0,51	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
133	0,49	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 9:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Hoppala“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
-12	0,95	Später Anöstrus
2	0,99	Proöstrus
5	0,69	Proöstrus
8	0,43	Östrus
12	0,66	Östrus – post ov.
35	0,29	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
119	0,24	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 10:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Myrte“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
-27	0,65	Später Anöstrus
1	1,23	Proöstrus
3	0,9	Proöstrus
5	0,67	Proöstrus
7	0,46	Östrus
9	0,56	Östrus – prä Ov.
11	0,69	Östrus – post Ov.
30	0,5	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
110	0,38	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 11:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „April“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
-48	0,67	Später Anöstrus
4	0,28	Östrus
5	0,33	Östrus – post Ov.
33	0,32	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
128	0,52	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 12:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Stöpsel“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
-38	0,27	Später Anöstrus
2	0,7	Proöstrus
3	0,63	Proöstrus
4	0,49	Östrus
5	0,4	Östrus – prä Ov.
8	0,4	Östrus – post Ov.
33	0,15	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
147	0,35	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 13:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Fanny“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
-7	0,72	Später Anöstrus
2	0,76	Proöstrus
5	0,45	Proöstrus
8	0,33	Östrus – prä ov.
10	0,36	Östrus – Ovulation
40	0,34	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
134	0,66	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 14:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Batida“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	Prog (ng/ml)	Zyklusstadium
-21	0,98	Später Anöstrus
2	0,99	Proöstrus
4	0,8	Proöstrus
7	0,58	Proöstrus
9	0,56	Östrus – prä ov.
11	0,54	Östrus – post ov.
28	0,57	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
132	0,56	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 15:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Lotte“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	Prog (ng/ml)	Zyklusstadium
-2	1,4	Später Anöstrus
1	1,51	Proöstrus
3	1,4	Proöstrus
6	0,84	Proöstrus
8	0,72	Proöstrus
10	0,62	Östrus
12	1,05	Östrus – prä ov.
14	1,3	Östrus – post ov.
31	0,6	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)

**Tabelle 15 (Fortsetzung)**

133	0,97	Mittlerer Anöstrus
-----	------	--------------------

**Tabelle 16:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Fine“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	Prog (ng/ml)	Zyklusstadium
-17	0,17	Später Anöstrus
3	0,09	Proöstrus
5	0,09	Östrus
7	0,11	Östrus – post ov.
34	0,12	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
136	0,12	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 17:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Irmi“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	Prog (ng/ml)	Zyklusstadium
-7	0,59	Später Anöstrus
1	0,82	Proöstrus
3	0,74	Proöstrus
5	0,52	Proöstrus
7	0,51	Östrus
9	0,44	Östrus – prä ov.
13	0,46	Östrus – post ov.
37	0,25	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
128	0,42	Mittlerer Anöstrus



**Tabelle 18:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Hermine“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
-43	1,5	Später Anöstrus
1	2,65	Proöstrus
4	2,07	Proöstrus
7	1,29	Proöstrus
9	0,87	Östrus – prä ov.
11	1,88	Östrus - Ovulation
30	2,1	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
136	0,88	Mittlerer Anöstrus

**Tabelle 19:** AMH-Serumkonzentrationen in ng/ml der Hündin „Dina“ zu den verschiedenen Messzeitpunkten mit Angabe des Zyklustags und Zyklusstadiums

Zyklustag	AMH (ng/ml)	Zyklusstadium
2	1,04	Proöstrus
3	0,89	Proöstrus
6	0,54	Proöstrus
8	0,53	Östrus – prä ov.
10	0,87	Östrus – post ov.
29	0,52	Metöstrus (ca. 28 d post ov.)
141	0,56	Mittlerer Anöstrus

## **XI      Danksagung**

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Studienbetreuerin Frau Prof. Andrea Meyer-Lindenberg herzlich für die Überlassung des Themas und bei Frau Dr. Beate Walter für die großartige Unterstützung während meiner Arbeit bedanken. Sie stand mir in allen Fragen und Problemen mit Rat und Tat zur Seite und verstand es auf elegante Art und Weise, Verbesserungen anzuregen und von Zeit zu Zeit meine Motivation zu stärken. Ich wünsche noch vielen zukünftigen Doktoranden, in das Vergnügen ihrer professionellen Betreuung zu kommen.

Auch das restliche Repro-Team der CTK soll an dieser Stelle lobenswert erwähnt werden, das jede meiner Fragen innerhalb und außerhalb der Arbeitszeit beantwortete und stets für ein angenehmes Arbeitsklima im Labor sorgte.

Großer Dank gebührt dem gesamten Team der Tierpfleger vom Oberwiesenfeld, die mich stets sehr hilfsbereit und freundlich bei meinen Untersuchungen an den Tieren vor Ort unterstützten und ohne deren Mitarbeit keine planmäßige Durchführung des Versuches zustande gekommen wäre.

Ich danke Herrn Dr. Sven Reese für die statistische Aufarbeitung meiner Versuchsdaten.

Ich möchte besonders meinen Eltern dafür danken, mich seit Schulzeiten immer wieder an die wichtigen Dinge im Leben erinnert zu haben und stets an meinen Durchhaltewillen zu appellieren. Danke für eure selbstverständliche Unterstützung, die ich schon manches Mal dringend gebraucht habe.

Hans Feulner  
Kulmbach 2020